

# **“Caracterización de Bacterias Utilizables en Procesos de Biorremediación de Aguas”**



Ainelén Piazza

Licenciada en Biotecnología

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Esta tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET), dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre los meses de abril de 2014 y marzo de 2019, bajo la dirección de la Dra. Natalia Gottig y la co-dirección de la Dra. Jorgelina Ottado.

## **Agradecimientos:**

Me gustaría en estas líneas expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de manera directa o indirecta han contribuido a que este trabajo se haya concluido de manera satisfactoria.

A la Dra. Jorgelina Ottado por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo de investigación y por brindarme toda su colaboración para que este trabajo llegue a buen puerto.

A mi directora de tesis, la Dra. Natalia Gottig, por confiar en mi para emprender este nuevo tema en el laboratorio. Por compartir todo su conocimiento científico, por ser una máquina de generar ideas, por su interés y compromiso con el trabajo de las personas que tiene a su cargo.

Al equipo del CIS, porque logramos un buen grupo de trabajo, colaborativo y eficiente. En especial a Virgi, por toda la ayuda en cada uno de los proyectos que emprendimos juntas, por compartir su experiencia con nosotras y siempre estar dispuesta para colaborar. A los chicos de IDEAR, por los viajes a San Lorenzo y los viajes eternos al norte de Santa Fe.

A la Dra. Regine Hengge, por haberme recibido en su laboratorio en la Universidad de Humboldt para realizar una estancia enriquecedora no sólo a nivel científico sino también a nivel personal. De manera muy especial, al Dr. Diego Serra, por ser una de las personas más humildes y generosas con las que me encontré en este camino. Por su buena voluntad, sus discusiones llenas de conocimientos y por haber contribuido con todo su apoyo para que mi viaje haya sido perfecto.

A mis tutores la Dra. Daniela Rial y el Dr. Leonardo Pérez, por haber realizado el seguimiento de este trabajo de Tesis, aportando ideas y sugerencias. Por haberse involucrado y por expresar siempre su interés por este trabajo.

A Ale Mussi, mi directora de tesina, quien me enseñó a trabajar en Microbiología, siempre dispuesta a colaborar conmigo y a quien tengo un especial cariño.

A mis compañeros de trabajo, con los que compartí la mayor parte del tiempo en este viaje. A Betiana, Ceci, Caro, Lu, Fiore y Vicky, por todos los momentos compartidos y por la ayuda diaria en la mesada. Especialmente a las chicas del grupo "Buenísimo", por ser buenas amigas, por el interés mutuo tanto por el trabajo como por la vida de cada una. Porque me aliviaron un montón de situaciones y porque siempre que me ocurre algo no veo la hora de juntarme con ustedes para contarles todo.

A Vicky F., Robi, Mariana, Vale y Julián, que tuvieron un paso más corto por el laboratorio pero que lograron todo mi aprecio y estima, en especial a Juli por haber sido mi primer tesinista.

A Bruno, Meli, Dami, Caro y Franco. Porque son los mejores compañeros que pudimos tener para compartir laboratorio. Por los ricos mates, la buena energía, los buenos momentos, la colaboración y la amistad.

A la gente del IBR, por la buena disposición para compartir protocolos, sugerencias y aportar ideas para solucionar los distintos inconvenientes que se fueron presentando a lo largo de mi trabajo. A todo el personal de apoyo del IBR que nos simplifica mucho nuestro trabajo diario. En particular, a Claudia porque escucha atentamente lo que le pedimos, y nos ayuda un montón diariamente.

A los amigos que me dejó la facultad, Coco, Marian y Pame. Por las cenas, los momentos y el grupo divertido que armamos. Los quiero mucho, me preocupo por cada uno de ustedes y espero sigamos en contacto por siempre.

A mis amigos de Corrientes, porque aunque no los veo seguido los tengo siempre presente y aprecio un montón.

A Berni, por haberme ayudado a volver al equilibrio en un momento complicado.

A la tía Mabel, por ser tan generosa y por el mutuo afecto. Por compartir todos los momentos conmigo y mis hermanas. Por querer a sus sobrinos tanto como a sus propios hijos.

A mis padres, por ser incondicionales, por motivarme y principalmente por enseñarme sus valores y la dignidad del trabajo. Por confiar siempre plenamente en mí y en lo que puedo hacer. Por haber dado su vida para que estudiemos y estemos hoy en el lugar que nos encontramos. A papi, por su sensibilidad extrema y por sentirse tan orgulloso de sus hijas. A mami, por su tenacidad y por ser una luchadora y un ejemplo en la vida, porque se sigue preocupando por cada una de nosotras como cuando éramos niñas y, a pesar de la distancia, todavía tiene el olfato para sentir lo que nos está pasando en todo momento.

A mis hermanas, unidas por siempre porque esa es la ley primera. Estoy muy orgullosa de cada una de ustedes porque son excelentes personas ante todo. Gracias por las interminables charlas, por la confianza mutua, por la motivación constante, por estar al tanto de todo y por todos estos años de amistad-hermandad única en el mundo. Las amo, las extraño, y mi vida no hubiera sido la misma si no hubieran sido mis hermanas. Fueron imprescindibles para estar hoy acá.

A Eloisa, la dulce niña que me hace explotar el corazón y me llena el alma. Porque me enseñaste que puedo amar a alguien tanto o más que a alguna de mis hermanas. Porque sos un pedacito de cielo que nos mata de amor a todos.

A Facu, por tanto amor! Por su amistad, compañerismo fiel, complicidad y confianza. Por ser mi cable a tierra y comprender mi trabajo. Porque estar juntos es el mejor plan de todos los días y porque su presencia y compañía fue muy importante en este camino.

Algunos resultados de este trabajo de tesis han sido publicados en:

**Revistas Científicas:**

- **Piazza, A., Ciano, L., Pacini, V.A., Sanguinetti, G., Ottado, J., Gottig, N. (2019).** "Environmental Bacteria Involved in Manganese(II) Oxidation and Removal from Groundwater". *Front. Microbiol.* 10:119. doi: 10.3389/fmicb.2019.00119

**Reuniones Científicas Nacionales e Internacionales:**

- **Piazza, A., Ciano, L., Pacini, V.A., Sanguinetti, G., Ottado, J., Gottig N.** "Characterization of Manganese(II)-oxidizing Bacterial Communities present in water treatment plants and isolation of the most efficient oxidizers"  
IV Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental (CAMAyA)  
Mar del Plata, Buenos Aires; Argentina. 2018.
- **Ciano, L., Piazza, A., Ottado, J., Gottig, N.** "Characterization of proteins involved in the Manganese(II)-oxidation process in *Pseudomonas resinovorans*"  
IV Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental (CAMAyA)  
Mar del Plata, Buenos Aires; Argentina. 2018.
- **Piazza, A.; Ciano, L.; Pacini, V.; Ingallinella, A.M.; Sanguinetti, G.; Ottado, J.; Gottig, N.** "Characterization of bacterial isolates in function of Mn(II) oxidation and biofilm formation"  
Fifth International Symposium on Environmental Biotechnology and Engineering (ISEBE)  
Buenos Aires; Argentina. 2016.
- **Ciano, L., Piazza, A., Pacini, V., Ingallinella, A.M., Sanguinetti, G., Ottado, J., Gottig, N.** "Development of a bacterial inoculum for removal of Mn(II) from human consumption groundwaters"  
Fifth International Symposium on Environmental Biotechnology and Engineering (ISEBE)  
Buenos Aires; Argentina. 2016.
- **Piazza, A.; Ciano, L.; Gottig, N.; Ottado, J.** "Searching novel proteins involved in Manganese(II) oxidation".  
III Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental (CAMAyA)  
Buenos Aires; Argentina. 2015.
- **Ciano, L.; Piazza, A.; Pacini, V.; Sanguinetti, G.; Ingallinella, A. M.; Ottado, J.; Gottig, N.** "Isolation and identification of novel Manganese(II) oxidizing bacteria"  
III Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental (CAMAyA)  
Buenos Aires; Argentina. 2015.
- **Piazza, A.; Pacini, V.; Sanguinetti, G.; Ingallinella, A. M.; Ottado, J.; Gottig, N.** "Molecular Identification and Characterization of Manganese Oxidizing Bacteria Isolated from Biological Water Treatment Plants"  
IV SOLABIAA Latin American Congress  
Florianópolis; Brasil. 2015.
- **Piazza, A., Pacini, V., Sanguinetti, G., Ingallinella, A. M., Ottado, J., Gottig, N.** "Isolation and Selection of Manganese Oxidizing Bacteria".  
X Congreso Argentino de Microbiología General (SAMIGE)  
Mar del Plata; Buenos Aires, Argentina. 2014.

- **Piazza, A., Pacini, V., Sanguinetti, G., Ingallinella, A. M., Ottado, J., Gottig, N.** "Identification of Manganese Oxidizing Bacteria Isolated from Biological Filtration Water Plants"  
L Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB)  
Rosario; Santa Fe, Argentina. 2014.

## Índice General

Índice General .....	6
Abreviaturas y Lenguaje Especial .....	10
Anglicismos .....	11
1 “Caracterización de Bacterias Utilizables en Procesos de Biorremediación de Aguas” .....	13
1.1 Introducción .....	13
1.1.1 Manganeso .....	13
1.1.2 El Fe y Mn en las Aguas de Consumo Humano .....	15
1.1.3 Tratamientos de Remoción de Fe y Mn .....	17
1.1.4 Experiencia Argentina en la Remoción Biológica de Fe y Mn .....	19
1.1.4.1 Proceso BioCIS-UNR® .....	20
1.1.4.2 Problemas Detectados durante la Implementación del Proceso BioCIS-UNR® .....	22
1.1.5 Bioaumentación .....	22
1.1.5.1 Criterio de Selección de Bacterias para Utilizar en Procesos de Bioaumentación .....	23
1.1.5.2 Experiencias de Bioaumentación en Sistemas de Filtración de Mn(II) de Aguas .....	24
2 Objetivos: .....	26
2.1 Objetivo General: .....	26
2.2 Objetivos Particulares: .....	26
3 Estudio y Caracterización de Comunidades Bacterianas Oxidantes de Mn(II) Presentes en Plantas de Tratamiento de Aguas de la Provincia de Santa Fe .....	27
3.1 Introducción .....	27
3.1.1 Bacterias Oxidantes de Mn(II) .....	27
3.1.2 Hábitats de MOB .....	29
3.1.3 Cultivo de MOB .....	29
3.2 Materiales y Métodos: .....	31
3.2.1 Recolección de Muestras .....	31
3.2.2 Procesamiento de las Muestras .....	32
3.2.2.1 Extracción de ADN de Muestras de Arena .....	32
3.2.2.2 Preparación de la Biblioteca de Genes 16S ARNr .....	33
3.2.2.3 Secuenciación y Asignación Taxonómica .....	34
3.2.3 Selección y Aislamiento de MOB .....	34
3.2.3.1 Conservación de Cepas .....	35
3.2.3.2 Identificación Molecular de las MOB Cultivadas .....	36
3.2.3.3 Análisis por MALDI-TOF MS .....	37
3.2.4 Caracterización de las MOB Seleccionadas .....	38
3.2.4.1 Ensayos de Oxidación de Mn(II) .....	38

3.2.4.2	Crecimiento Bacteriano .....	39
3.2.4.3	Ensayos de Formación de Biofilm .....	39
3.2.4.4	Ensayos de Interacción en el Crecimiento entre MOB .....	39
3.2.4.5	Cuantificación de la Oxidación de Mn(II) en Agua Efectuada por MOB Inmovilizadas en Arena .....	40
3.3	Resultados .....	40
3.3.1	Análisis Físico-químico de las Aguas de Las Toscas y Villa Ocampo ....	40
3.3.2	Caracterización de la Diversidad Bacteriana Asociada a los Filtros de Remoción Biológica de Mn(II) de Las Toscas y Villa Ocampo .....	42
3.3.3	Selección y Aislamiento de Bacterias Oxidantes de Mn.....	47
3.3.3.1	Identificación Molecular de las MOB Seleccionadas .....	48
3.3.4	Caracterización de las MOB Cultivables Elegidas .....	56
3.3.4.1	Estudio de la Capacidad de Oxidación de Mn(II).....	56
3.3.4.2	Estudio de la Capacidad de Formación de Biofilm .....	59
3.3.4.3	Influencia de la Temperatura en la Capacidad de Oxidación de Mn(II) de las MOB Seleccionadas .....	61
3.3.4.4	Variabilidad de la Oxidación de Mn(II) en Presencia de Diferentes Metales en el Medio de Cultivo .....	63
3.3.4.5	Ensayos de Interacción en el Crecimiento de MOB.....	64
3.3.4.6	Oxidación Mn(II) Presente en Aguas Subterráneas por MOB Inmovilizadas .....	65
3.4	Discusión .....	66
4	Caracterización Microscópica de la Oxidación de Mn(II) y la Formación de Biofilm en MOB .....	73
4.1	Introducción .....	73
4.1.1	Formación de Biofilms .....	73
4.1.2	Modelos de Biofilms Bacterianos .....	74
4.1.3	Producción y Detección de Exopolisacáridos.....	77
4.1.3.1	Ensayos de Morfología de Macrocolonia en Agar .....	80
4.1.4	Relación entre la Formación de Biofilms, la Producción de EPS y la Oxidación de Mn(II) .....	81
4.2	Materiales y Métodos.....	82
4.2.1	Crecimiento de Macrocolonias.....	82
4.2.2	Estereomicroscopía .....	83
4.2.3	Crio-sección de Biofilms de Macrocolonia y Microscopía de Fluorescencia 83	
4.2.4	Ensayos de Actividad Oxidante de Mn(II) <i>in gel</i> .....	84
4.2.4.1	Inducción de la Expresión de Proteínas Recombinantes en <i>E. coli</i> ....	84
4.2.4.2	Obtención de extractos proteicos de <i>E. coli</i> .....	84

4.2.4.3	Obtención de Extractos Proteicos de MOB-181 .....	85
4.2.4.4	Electroforesis de Proteínas en Geles de Poliacrilamida Nativos, Ensayos de Actividad Oxidante de Mn(II) y Tinción con Coomassie Blue Coloidal 85	
4.3	Resultados .....	86
4.3.1	Estudio de la Morfología de las Macrocolonias de MOB-181 y Producción de EPS 87	
4.3.2	Caracterización de la Producción de Exopolisacáridos en las Macrocolonias de MOB-181.....	91
4.3.3	Detección de Actividad Oxidante de Mn(II) en MOB-181 .....	99
4.4	Discusión.....	100
5	Inoculación a Escala de Laboratorio con el Aislado .....	107
5.1	Introducción.....	107
5.2	Materiales y Métodos.....	108
5.2.1	Construcción de un Sistema de Filtros a Escala de Laboratorio .....	108
5.2.2	Caracterización Microbiológica del Agua Cruda de SL .....	109
5.2.3	Determinación de la Concentración de Biomasa Requerida para Inocular la Arena de los Filtros al Inicio del Ensayo de Remoción de Mn(II) .....	109
5.2.3.1	Ensayos de Producción de Formazán de Células de MOB-181 Crecidas en Presencia de la Sal de Tetrazolio TTC .....	110
5.2.3.2	Ensayos de Oxidación de Mn(II) de las Células de MOB-181 Adheridas para Determinar la Concentración Óptima de Inóculo .....	112
5.2.4	Ensayo de Remoción de Mn del Agua a Escala Laboratorio.....	114
5.2.4.1	Métodos Analíticos.....	114
5.2.5	Distribución de la Oxidación de Mn(II) en los Filtros .....	115
5.2.5.1	Determinación de la Presencia de MOB en los Filtros al Finalizar el Ensayo de Remoción de Mn(II) .....	115
5.2.6	Extracción de ADN, Secuenciación y Preparación de la Biblioteca de ARNr 16S .....	115
5.3	Resultados .....	116
5.3.1	Criterios de Selección Bacteriana .....	116
5.3.2	Sistema de Filtrado a Escala de Laboratorio.....	117
5.3.3	Estrategias de Inoculación.....	119
5.3.3.1	Determinación de la Concentración de MOB-181 Óptima para Inocular en la Arena de los Filtros.....	119
5.3.4	Impacto de la Bioaumentación en la Capacidad de Remoción de Mn(II) de Aguas .....	122
5.3.4.1	Primer Período de Estudio .....	122
5.3.4.2	Segundo Período de Estudio .....	132
5.4	Discusión.....	144



6	Conclusiones .....	155
7	Resumen .....	158
8	Referencias .....	160

## Abreviaturas y Lenguaje Especial

μg: microgramo  
μL: microlitro  
μM: micromolar  
% (v/v): concentración por ciento volumen en volumen  
% (p/v): concentración por ciento peso en volumen  
ADN: ácido desoxirribonucleico  
ARN: ácido ribonucleico  
ARNr: ácido ribonucleico ribosomal  
CAA: Código Alimentario Argentino  
CaCl<sub>2</sub>: cloruro de calcio(II)  
CB: azul brillante de Coomassie  
CF: CalcoFlúor  
CoCl<sub>2</sub>: cloruro de cobalto(II)  
CV: cristal violeta  
d: días  
dNTP: desoxi nucleósido 5'-trifosfato  
DO: densidad óptica  
DO<sub>600nm</sub>: densidad óptica 600nm  
DS: desviación estándar  
EPS: exopolisacáridos  
EtOH: etanol  
F: filtro  
Fe: hierro  
FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: sulfato de hierro(II) heptahidratado  
GFP: proteína verde fluorescente  
h: horas  
H<sub>2</sub>O: agua  
Hepes: N-2-hydroxyetilpiperazina-N'-2- ácido etanosulfónico  
IPTG: isopropil-β-D-tiogalactopiranosido  
KMnO<sub>4</sub>: permanganato de potasio  
L: litro  
LB: medio Luria-Bertani  
LBB: Azul de Leucoberbelina  
Lept: medio de cultivo para selección de bacterias oxidantes de Mn(II)  
LT: Las Toscas  
M: molar  
mA: miliamperio  
MALDI-TOF MS: Espectrometría de Masas MALDI-TOF  
Medio Mn: medio de cultivo para selección de bacterias oxidantes de Mn(II)  
MetOH: metanol  
mg: miligramos  
MgSO<sub>4</sub>: sulfato de magnesio(II)  
min: minutos  
mL: mililitros  
mM: milimolar  
Mn: manganeso  
MnCl<sub>2</sub>: cloruro de manganeso(II)  
MnSO<sub>4</sub>: sulfato de manganeso (II)

MnOx: óxidos de Mn  
 MOB: "manganese oxidizing bacteria": bacteria oxidante de Mn(II)  
 NaCl: cloruro de sodio  
 Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>: molibdato de sodio(II)  
 ng: nanogramos  
 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: sulfato de amonio  
 O<sub>2</sub>: oxígeno molecular  
 OD: oxígeno disuelto  
 OMS: Organización Mundial de la Salud  
 OTU: Unidad Taxonómica Operativa  
 PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida  
 pb: pares de bases  
 PC: medio de cultivo para selección de bacterias oxidantes de Mn(II)  
 PCR: reacción en cadena de la ADN polimerasa  
 PF: pre-filtro  
 pH: potencial of hidrógeno  
 PMSF: fenil metil sulfonil fluoruro (Inhibidor de serin-proteasas)  
 RC: rojo congo  
 rpm: revoluciones por minuto  
 s: segundo  
 SDS: dodecil sulfato sódico  
 TTC: cloruro de 2, 3, 5-trifenil tetrazolio  
 TS: Tioflavina S  
 UFC: unidades formadoras de colonias  
 VO: Villa Ocampo  
 ZnSO<sub>4</sub>: sulfato de cinc(II)

## Anglicismos

*Batch*: Método de cultivo simple en el que el microorganismo crece a partir de una limitada cantidad de medio hasta que se agota un nutriente esencial o se acumulan productos tóxicos hasta niveles que inhiben el crecimiento.

*Biofilm*: ecosistema microbiano organizado, conformado por uno o varios tipos de microorganismos asociados a una superficie viva o inerte.

*Buffer*: solución reguladora, amortiguadora o tampón. Es una mezcla de un ácido débil y su base conjugada, y tienen la propiedad de mantener estable el pH de una solución frente a la adición de otras sustancias.

*In vitro*: término utilizado para referirse a técnicas o experimentos llevados a cabo generalmente en ambiente y condiciones controladas fuera del organismo vivo.

*Pellet*: sedimento obtenido en el fondo de un tubo luego de la centrifugación.

*Pellicle*: estructuras multicelulares similares a biofilms que flotan en la interfase líquido-aire. Los requisitos para la formación de este tipo de agrupaciones, son el contacto entre células, la acumulación de exopolisacáridos y, además, el crecimiento en condiciones estáticas

*Quorum sensing*: detección de quórum o autoinducción, es un mecanismo por el cual un conjunto de células independientes, bajo la generación de señales extracelulares, desarrolla comportamientos sociales coordinados.

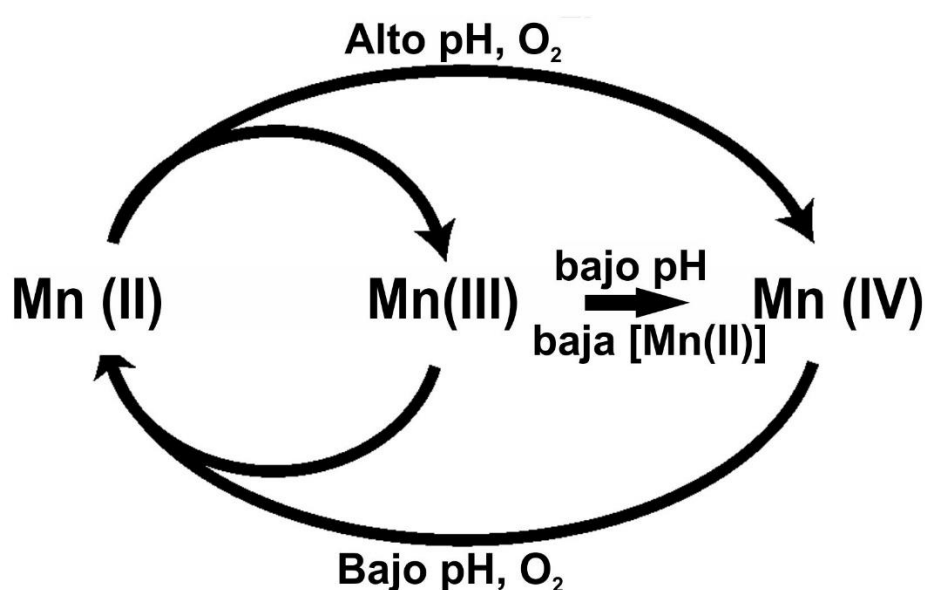
*Score*: Puntaje que se le asigna a algunos análisis bioinformáticos que indican la posibilidad de que dos parámetros sean los mismos.

# 1 “Caracterización de Bacterias Utilizables en Procesos de Biorremediación de Aguas”

## 1.1 Introducción

### 1.1.1 Manganeso

El manganeso (Mn) comprende aproximadamente el 0,1 % de la masa total de la Tierra (Tebo *et al.*, 2004), es el quinto metal de transición más abundante y es el segundo metal traza más común después del hierro (Fe) (Francis *et al.*, 2001; Francis y Tebo, 2001). El Mn se parece al Fe en varios aspectos de su geoquímica y este parecido se debe en parte al hecho de que estos metales se producen en múltiples estados de valencia en el medio ambiente y son micronutrientes esenciales para la mayoría de los organismos. Entre los diversos estados de oxidación del Mn, el +II, +III y +IV son los más prevalentes en la naturaleza (Figura 1.1.).



**Figura 1.1. El ciclo de estados de oxidación del Mn encontrado en la naturaleza.** El Mn(II) es termodinámicamente estable en ausencia de O<sub>2</sub> y a un pH bajo, mientras que en presencia de O<sub>2</sub> y a pH alcalino se favorecen los óxidos de Mn que se producen principalmente como óxidos insolubles de Mn. Adaptado de (Tebo *et al.*, 2004).

En ambientes acuáticos, el Mn existe en dos formas principales: Mn(II) y Mn(IV) (Tebo *et al.*, 2004). En general, el Mn(II) se favorece termodinámicamente en ausencia de oxígeno y a pH bajo, mientras que el Mn(III) y el Mn(IV) se favorecen en presencia de oxígeno y a pH alto (Figura 1.1). El Mn(III), es termodinámicamente inestable, en medios acuosos produce Mn(II) + Mn(IV) y persiste solo en ciertos complejos orgánicos solubles (Klewicky y Morgan, 1999; Kostka *et al.*, 1995) y en algunos minerales (Lanson *et al.*, 2000)

La oxidación homogénea abiótica del Mn(II) por el oxígeno es muy lenta a de pH<9 (Morgan, 2000; Stumm y Morgan, 1996 ), por lo que a los valores usuales de pH encontrados en la mayoría de las aguas naturales (entre 6 y 8) el Mn(II) es oxidado en muy baja proporción. Una explicación que se ha propuesto para esta resistencia de los iones Mn(II) a la oxidación homogénea por O<sub>2</sub> es el requisito de la alta energía de activación de la reacción (Nealson, 2006). Otra explicación propuesta es que el Mn(II) puede formar complejos y, por lo tanto, estabilizarse con iones inorgánicos tales como el cloruro, el sulfato y el bicarbonato o por compuestos orgánicos como los aminoácidos y los ácidos húmicos (Tebo *et al.*, 2005).

Una amplia variedad de microorganismos (bacterias, hongos y algas) son capaces de oxidar el Mn(II) a óxidos de Mn(III / IV) y aceleran en gran medida la velocidad de la reacción. Las bacterias y los hongos se consideran los principales grupos de organismos oxidantes de Mn, mientras que las algas generalmente oxidan este metal en combinación con las bacterias (Stuet *et al.*, 1996). La oxidación del Mn(II) puede ocurrir a través de procesos enzimáticos o no enzimáticos. El proceso de oxidación de Mn(II) no enzimático implica la oxidación química directa de Mn(II) o la oxidación por productos finales metabólicos (Linhardt, 1997). Los microorganismos realizan el proceso enzimático de diferente manera y se clasifican en: (i) los que oxidan el Mn(II) disuelto, (ii) los que oxidan el Mn(II) que está pre-unido a sólidos y (iii) los organismos que oxidan el Mn(II) disuelto por el metabolito H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizando la enzima catalasa.

A pesar del hecho de que diversos microorganismos tienen la capacidad de oxidar Mn(II), la función fisiológica de la oxidación de dicho metal aún es desconocida.

### 1.1.2 El Fe y Mn en las Aguas de Consumo Humano

El Fe y el Mn poseen propiedades comunes y se hallan con frecuencia asociados en la naturaleza (Sommerfeld, 1999). Cuando ambos metales están presentes en el agua, ésta adquiere coloraciones que producen rechazo del consumidor al afectar la calidad estética de la misma. El Fe produce una coloración marrón rojiza y el Mn una coloración gris a negra. El sabor del agua es algo astringente y metálico, muy notable si el contenido de Fe es mayor a 1 mg L<sup>-1</sup>, y se producen manchas en artefactos sanitarios en contacto con el agua, especialmente cuando hay pérdidas, y en la ropa lavada (Dimitrakos Michalakos *et al.*, 1997). De esta manera, la presencia de concentraciones elevadas de Fe y Mn altera procesos industriales que requieren agua de fabricación clara e incolora, en especial, en la industria textil, industria lechera, de bebidas, papeleras, etc. (Pacini *et al.*, 2005).

Una de las principales desventajas de la presencia de iones ferrosos y manganosos en el agua de consumo es que, en el proceso de desinfección por cloración, se produce la inmediata oxidación de dichos iones a la forma férrica y mangánica y, hasta que no se completa dicha reacción, el cloro no puede iniciar su acción bactericida. De esta forma, se exponen estas aguas a una condición no segura desde el punto de vista microbiológico al consumirse químicamente el cloro. Esto puede inducir además a que se prescinda de una correcta desinfección con el fin de evitar la formación de los molestos precipitados de color marrón o negro (Sly *et al.*, 1990).

Los ambientes acuáticos con Fe y Mn suelen contener bacterias que oxidan estos metales y los depositan sobre su superficie celular (Gariboglio, 1996). Estas bacterias se multiplican tanto en el interior de los pozos de bombeo como en la red de distribución de abastecimiento de agua potable, por lo que son consideradas importantes agentes de deterioro de la calidad del agua. Por otra parte, estas bacterias son reconocidas como agentes indirectos de corrosión e incrustación en tuberías y filtros de pozos de bombeo. Esto se debe a su capacidad de formación de biofilms, es decir, comunidades compuestas de células bacterianas que se adhieren a entidades inertes o activas (Douterelo *et al.*, 2014; Hamilton, 2003). Algunas de estas bacterias con fuerte capacidad de formación de biofilm se agregan a otros microorganismos y, dado que consumen oxígeno, crean nichos microaeróbicos que están colonizados por bacterias

reductoras de sulfato que participan activamente en la corrosión de las superficies metálicas (Gariboglio y Smith, 1993; Hamilton, 2003). Esto produce una acumulación de grandes cantidades de óxidos junto con el material biológico y la reducción de la capacidad de transporte del agua en las redes de distribución. Además, estos materiales suelen desprenderse ante una variación de la presión, produciendo turbiedades muy elevadas y los correspondientes reclamos de los consumidores. Otra consecuencia de la formación de biofilms en las redes de distribución es que éstos pueden alojar microorganismos patógenos y ofrecer una barrera que los protege de los agentes desinfectantes, afectando de esta forma la calidad microbiológica del agua de consumo (Pacini *et al.*, 2005).

En la Tabla 1.1. se muestran los valores máximos de concentraciones de Fe y Mn establecidos en el Código Alimentario Argentino (CAA) y los valores máximos obligatorios y recomendados, fijados en las Normas de Calidad de Agua Potable, Ley 11220, que están vigentes en la Provincia de Santa Fe desde enero de 1996 (ENRESS, 1996). Asimismo, se incluyen los valores guía fijados por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

**Tabla 1.1. Concentraciones máximas de Fe y Mn en distintas normativas.**

Parámetro (mg L <sup>-1</sup> )	OMS Valor guía (aceptabilidad)	CAA Límite Máx.	Sta Fe Ley 11220	
			Límite Obligatorio	Límite Recomendado
Fe Total	0,30	0,30	0,20	0,10
Mn Total	0,10	0,10	0,05	0,05

Los límites adoptados (Tabla 1.1.) son fijados para paliar los inconvenientes organolépticos causados por la presencia de estos metales. Cuando las concentraciones de Fe y Mn exceden estos nivel recomendados en los sistemas de agua surgen los problemas descriptos previamente. Por lo tanto, ambos compuestos deben eliminarse del agua de consumo humano.

El Fe y el Mn se encuentran tanto en aguas superficiales como subterráneas. Cuando las aguas superficiales contienen concentraciones de Fe y Mn, éstos se encuentran generalmente en sus estados oxidado y precipitado y



se eliminan mediante los tratamientos convencionales de clarificación. Por el contrario, las aguas subterráneas, desprovistas de oxígeno y con contenidos de Fe y Mn disueltos, son las que necesitan de tratamientos especiales para su potabilización (ENOHSA, 1998).

### 1.1.3 Tratamientos de Remoción de Fe y Mn

Para eliminar el Mn y el Fe de aguas subterráneas se emplean tanto métodos biológicos como físico-químicos (Mamchenko *et al.*, 2009). El proceso de eliminación físico-químico implica el agregado de reactivos químicos para aumentar el potencial de oxidorreducción del agua para que el Fe y el Mn presentes se conviertan en sus formas oxidadas insolubles (Pacini *et al.*, 2014). En este tipo de tratamientos, los resultados suelen considerarse insostenibles (Burger *et al.*, 2008). Esto se debe principalmente al aumento en el costo de operación, como resultado de los costosos productos químicos para el tratamiento, y los impactos secundarios que surgen de la formación de residuos y subproductos (Gallard y von, 2002).

Por otro lado, la purificación de aguas contaminadas utilizando sistemas de biofiltración es uno de los procesos vistos actualmente como ejemplo de biotecnología ambiental sostenible, ya que emplea comunidades microbianas que eliminan contaminantes del agua y proveen agua potable limpia a la sociedad. Se puede definir como un biofiltro a cualquier tipo de filtro que contenga una biomasa adjunta en el medio filtrante (Logsdon *et al.*, 2002). En este tipo de sistemas están implicadas reacciones de oxidación y reducción que son beneficiosas tanto para el microorganismo como para el hombre (Rittmann, 2010). El objetivo de estas tecnologías es optimizar el rendimiento de los sistemas mediante la caracterización de las comunidades microbianas en términos de: (i) los tipos de microorganismos presentes, (ii) las funciones metabólicas que desempeñan estos microorganismos y (iii) su interacción entre sí y con el ambiente (Rittmann, 2010).

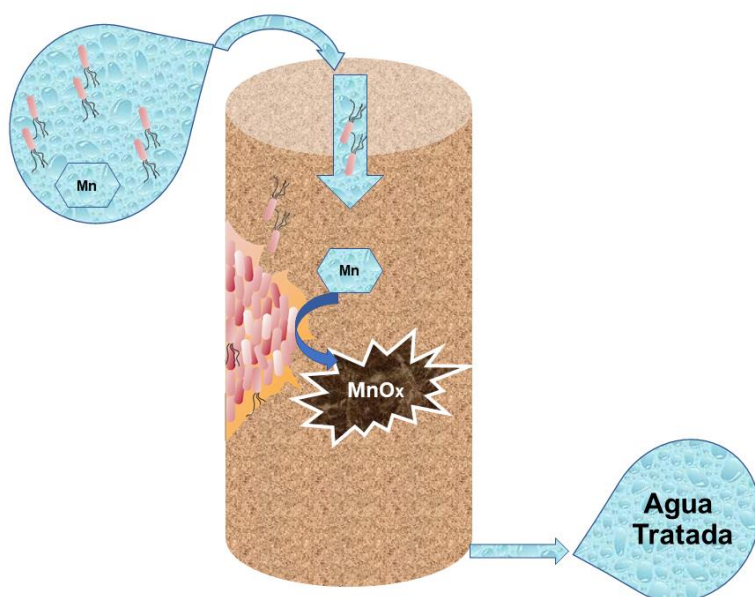
Hace varios años se utilizan biofiltros para la eliminación de Fe y Mn de aguas en Europa (Cameron, 1998), especialmente en Francia, y en otros países en desarrollo como los de América del Sur y la India (Marsidi *et al.*, 2018). También se han instalado sistemas de biofiltración en Canadá y ha ganado aceptación como una opción de tratamiento rentable para la eliminación metales

del agua (Burger *et al.*, 2008). Algunos de estos sistemas de filtración biológica rápida están protegidos por patentes (Mouchet, 2000) y generalmente consisten en una o más etapas de filtros, combinados de distinta forma según el agua contenga sólo Fe, sólo Mn, o ambos metales en forma conjunta (Bourguine *et al.*, 1994; Czekalla *et al.*, 1985; Gislette y Mouchet, 1997; Mouchet, 1992). Durante el tratamiento, el agua cruda conteniendo Fe y Mn se pasa a través de un medio filtrante granular que inmoviliza bacterias oxidantes de estos metales (Burger *et al.*, 2008). Las bacterias se mantienen en el sistema formando biofilms y oxidando los metales presentes en el agua. Los óxidos insolubles generados se acumulan sobre la superficie celular y sobre el biofilm bacteriano. Antes del filtro, suele haber un paso previo de oxigenación para garantizar que los microorganismos heterótrofos responsables de la oxidación tengan suficiente oxígeno para funcionar normalmente (Burger *et al.*, 2008).

La purificación del agua contaminada con Fe en estos sistemas no es compleja, dado que el Fe suele eliminarse en la etapa de aireación, ya que se oxida rápidamente en presencia de oxígeno y el producto de la oxidación de Fe sirve además como catalizador para la oxidación del Mn (Pacini *et al.*, 2005). Posteriormente, el Mn se elimina en otra etapa de filtración (Pacini *et al.*, 2005). Luego, los productos de la oxidación del Mn y del Fe acumulados se eliminan del filtro mediante un lavado a contracorriente y algunos de los productos restantes se depositan en la matriz del filtro, lo que sirve como un catalizador para que se produzca una oxidación adicional (Mamchenko *et al.*, 2009).

La presencia de Mn en el agua suele complicar el proceso, ya que es más estable que el Fe en condiciones aeróbicas (Mamchenko *et al.*, 2009). Para que se dé la oxidación completa del Mn(II) es necesaria la presencia de microorganismos que la catalicen (Tebo *et al.*, 2004). Los tiempos de maduración para los filtros biológicos de remoción de Mn(II) pueden variar de semanas a meses y estos períodos pueden diferir mucho entre dos plantas de tratamiento, aún con la misma calidad de agua cruda (Mouchet, 1992). Probablemente, el lapso que transcurre antes que comience activamente la remoción de Mn depende, principalmente de la calidad bacteriológica y parcialmente de la calidad físico-química del agua cruda (Seppänen, 1988).

En la Figura 1.2. se representa esquemáticamente el funcionamiento de los sistemas de filtración biológicos de aguas conteniendo Mn para una mejor visualización de los mismos.



**Figura 1.2. Esquema del tratamiento de remoción biológica de Mn de aguas subterráneas.** Se grafica un filtro de arena donde se puede visualizar cómo las bacterias son retenidas en el sistema al formar biofilms sobre la arena. Las bacterias capaces de oxidar el Mn llevan a cabo la reacción, acumulando los MnOx sobre los biofilms. De este modo, el agua sale del sistema de filtros libre de metales.

#### 1.1.4 Experiencia Argentina en la Remoción Biológica de Fe y Mn

La presencia de Fe y Mn en las aguas subterráneas para consumo humano es un problema ampliamente distribuido en la República Argentina y está resuelto en un porcentaje muy reducido. Se ha detectado la presencia de Fe y Mn en aguas subterráneas que son fuente de abastecimiento para una gran cantidad de poblaciones de las provincias de Santa Fe, Entre Ríos y Chaco, en una amplia franja a ambos lados del Río Paraná, con concentraciones en general menores a  $2 \text{ mg L}^{-1}$  para ambos metales. Además se conoce la existencia de Fe y Mn en las provincias de Salta, Corrientes, Misiones, Buenos Aires, entre otras. En esta última provincia se detectaron, en acuíferos del Partido de la Costa, concentraciones de Fe que pueden llegar a  $12 \text{ mg L}^{-1}$ . En la provincia de Santa Fe, se conoce que más de 30 localidades pequeñas y medianas presentan Fe y Mn en el agua de abastecimiento en concentraciones que superan la normativa vigente (Pacini *et al.*, 2014). Dado que muchas de estas poblaciones no tienen acceso a otro tipo de suministro de aguas potables, se han aplicado métodos de

filtración biológica para eliminar estos metales tales como el proceso BioCIS-UNR® que se describe a continuación.

#### 1.1.4.1 Proceso BioCIS-UNR®

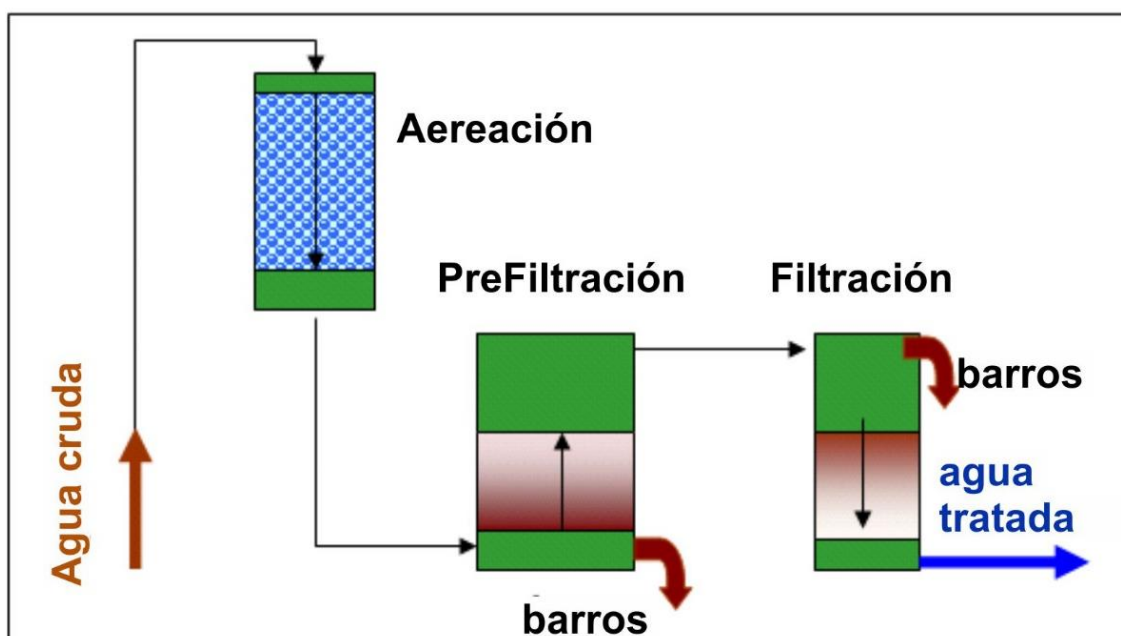
El Proceso de remoción biológica de Fe y Mn BioCIS-UNR® fue desarrollado en el Centro de Ingeniería Sanitaria (CIS), perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas, Ingeniería y Agrimensura de la Universidad Nacional de Rosario. Este proceso demostró ser una tecnología apropiada debido a los excelentes resultados obtenidos en extensas pruebas en planta piloto con distintas calidades de agua cruda. Las ventajas de este sistema son muy importantes cuando se lo compara con los procesos físico-químicos convencionales de remoción de Fe y Mn, como se puede observar en la Tabla 1.2.

**Tabla 1.2.: Comparación entre el proceso BioCIS-UNR® y los tratamientos físico-químicos convencionales**

<b>Proceso BioCIS-UNR®</b>	<b>Tratamientos físico-químicos convencionales</b>
No se utilizan productos químicos. Debido a que intervienen mecanismos de remoción biológica, no requiere la manipulación de productos químicos y por este motivo es un proceso natural y seguro.	Se utilizan entre dos y tres productos químicos. Esto encarece los costos de instalación, operación y mantenimiento debido a la incorporación de bombas dosificadoras, almacenamiento de productos químicos, personal especializado, etc.
Se pueden utilizar velocidades de filtración más elevadas por lo que las plantas resultan más compactas y con menores superficies filtrantes.	Las velocidades de filtración no son elevadas, por lo que las plantas resultan de mayor magnitud. Esto repercute en los costos de instalación.
No requiere mano de obra especializada para su operación debido a que el sistema es de muy sencilla operación.	Se requiere mano de obra especializada para su operación debido a la complejidad del proceso de tratamiento.
Los barros que se generan luego de lavar el sistema de filtros son más fáciles de tratar debido a la no incorporación de productos químicos, lo que produce un menor impacto ambiental.	Los barros que se generan son de mayor volumen y distinta composición química, por lo que el tratamiento es más engorroso, de mayor costo e impacto ambiental negativo.

Costo de instalación un 50 % inferior comparado con un tratamiento físico-químico.	Altos costos de instalación. La necesidad de incorporación de productos químicos involucra la instalación de bombas dosificadoras y demás equipos electromecánicos.
Costos operativos y de mantenimiento 80 % inferior a los tratamientos físico-químicos.	Altos costos operativos y de mantenimiento.

En el Proceso BioCIS-UNR®, el Fe y Mn contenido en el agua subterránea son oxidados y precipitados mediante la actividad de bacterias ambientales que generalmente están presentes en forma natural en pozos de agua, cisternas y redes de distribución en contacto con aguas a tratar. Dependiendo de la ocurrencia simultánea o no de Fe y Mn, la línea de tratamiento puede estar formada por las siguientes operaciones básicas: aeración, pre-filtración gruesa y filtración rápida (Figura 1.3.). En función de las concentraciones de ingreso, las concentraciones de Fe en el agua filtrada que se pueden alcanzar pueden ser menores a  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$  y las concentraciones de Mn menores a  $0,03 \text{ mg L}^{-1}$ . Dichas concentraciones están dentro de los límites exigidos por la normativa vigente (Tabla 1.1.).



**Figura 1.3. Esquema del sistema BioCIS-UNR® para el tratamiento de aguas con contenido de Fe y Mn.** El agua se somete a un paso de aeración, donde precipita la mayor parte de Fe(II), que luego es retenido en el pre-filtro ascendente. El agua continúa hacia un filtro descendente donde se da principalmente la remoción biológica del Mn(II).

#### **1.1.4.2 Problemas Detectados durante la Implementación del Proceso BioCIS-UNR®**

El proceso BioCIS-UNR® requiere de un período de puesta en régimen en el cual las bacterias presentes en el agua colonizan completamente los mantos filtrantes formando biofilms que oxidan y retienen el Fe y el Mn y, en ese punto, alcanza la eficiencia máxima de remoción de estos metales. Durante la implementación del proceso en diferentes regiones de nuestro país se ha observado que, tal como se describió en una gran variedad de sistemas, el Fe se oxida rápidamente con alta eficiencia por aereación y posteriormente queda retenido en el sistema de filtración (Pacini *et al.*, 2014; Pacini *et al.*, 2005), pero los tiempos de maduración de los filtros para la eliminación de Mn son muy lentos y/o la eliminación de este metal es poco eficaz (Pacini *et al.*, 2014). Si las aguas a tratar contienen bacterias oxidantes de Mn (MOB), quienes pueden aumentar en gran medida la tasa de oxidación de Mn(II) (Bai *et al.*, 2013; Katsoyiannis y Zouboulis, 2004), el período de puesta en régimen abarca desde 4 a 8 semanas. Sin embargo, muchas veces se requieren extensos tiempos debido a la falta de tales microorganismos específicos capaces de ser retenidos en los filtros y de llevar a cabo la oxidación del Mn(II). Por otro lado, en muchos casos se logran eficiencias de eliminación insatisfactorias debido a la pérdida de los microorganismos oxidantes, que son constantemente lavados del sistema. La empresa IDEAR S.A ha instalado en Argentina a la fecha más de diez plantas basadas en el proceso BioCIS-UNR® con distintos grados de dificultad en lo que respecta al tiempo de puesta en régimen para la filtración del Mn(II). En las experiencias realizadas por esta empresa, tanto a escala piloto como en plantas a escala real (Pacini *et al.*, 2014; Pacini *et al.*, 2005) se observaron durante la puesta en marcha períodos de maduración que variaron entre 8 semanas y 6 meses, tal como como ha ocurrido en otros sistemas de filtrado similares (Hope y Bott, 2004; Mouchet, 1992; Seppänen, 1988).

#### **1.1.5 Bioaumentación**

La bioaumentación consiste en el agregado de microorganismos para "reforzar" las poblaciones de bacterias presentes en el lugar a tratar, de manera que puedan reducir efectivamente la carga de contaminantes al transformarla en compuestos menos peligrosos. En un proceso de bioaumento, las condiciones

ambientales y la competencia con las poblaciones naturales del agua determinan en gran medida la supervivencia y la actividad de los microorganismos introducidos (van Veen *et al.*, 1997; Vogel, 1996). La actividad de la/s cepa/s introducida/s en el biofiltro va a estar influenciada principalmente por factores tales como: la competencia con la microbiota indígena, la presencia de bacteriófagos o la falta de aclimatación a las condiciones ambientales, etc. Es deseable que los microorganismos introducidos colonicen los sistemas y muestren predominio de la población en un contexto tan dinámico que está sujeto a condiciones cambiantes, como períodos de inanición, pH o variaciones de carga y bajas temperaturas. La inoculación con microorganismos autóctonos de la zona podría superar estas limitaciones del bioaumentación (Herrero y Stuckey, 2015).

#### **1.1.5.1 Criterio de Selección de Bacterias para Utilizar en Procesos de Bioaumentación**

Se ha demostrado que diferentes opciones de bioaumentación resultaron útiles en la práctica, las cuales van desde el uso de productos comerciales, colecciones de cepas exógenas/indígenas, hasta consorcios de bacterias autóctonas. Sin embargo, se ha detectado que entre una de las posibles razones de los fallos de la bioaumentación, se destaca la falta de aclimatación, es decir, mecanismos de adaptación fisiológicos que permiten que los microorganismos sobrevivan y permanezcan activos en condiciones ambientales adversas (Stephenson y Stephenson, 1992).

Los microorganismos utilizados en las estrategias de bioaumentación deben cumplir con al menos tres criterios: en primer lugar, ser catabólicamente capaces de degradar el contaminante, incluso en presencia de otros contaminantes potencialmente inhibidores; en segundo lugar, deben persistir y ser competitivos después de su introducción en el biosistema; y en tercer lugar, deben ser compatibles con las comunidades indígenas presentes (Yu y Mohn, 2002). Por lo tanto, los candidatos deben ser seleccionados cuidadosamente, ya que solo unos pocos organismos son aptos para la bioaumentación. Un punto importante adicional es que, por razones obvias, los candidatos no deben estar estrechamente relacionados con patógenos humanos (del mismo género y

especie, como lo ejemplifican algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*) cuando se usan en la implementación a campo (Singer *et al.*, 2005).

La selección de cepas para la bioaumentación es claramente un tema clave para poder lograr avances sustanciales en la remoción de contaminantes del medio ambiente.

#### **1.1.5.2 Experiencias de Bioaumentación en Sistemas de Filtración de Mn(II) de Aguas**

Diversos estudios han mostrado que la bioaumentación con bacterias específicas en los sistemas de filtrado ha resultado ser de gran utilidad para acelerar los tiempos de maduración de los biofiltros y de remoción de Mn de aguas. Se demostró que los biofiltros pudieron ser inoculados exitosamente con cultivos de *Leptothrix discophora*, producidos en el laboratorio, y que la aplicación de esta técnica a escala real redujo los tiempos de maduración del filtro de meses a días (Hope y Bott, 2004). Por otro lado, se demostró que tanto la inoculación en columnas de filtración experimentales con bacterias indígenas provenientes de biofilms de una planta de biofiltración de Mn(II), como con una suspensión de cultivo puro de *L. discophora* aceleró los procesos de remoción de Mn(II) (Burger *et al.*, 2008). Recientemente, se utilizó la estrategia del bioaumento con la cepa oxidante de Mn(II), *Pseudomonas* sp. QJX-1, para el tratamiento de aguas subterráneas que contienen Fe(II), Mn(II), As(III) y Sb(III), y se demostró que la cepa inoculada aceleró la formación de óxidos de Fe-Mn, lo que resultó además en una mejora en la eliminación de As(III) y Sb(III) en filtros de arena (Bai *et al.*, 2016).

Además, se ha sugerido la inmovilización de microorganismos con la capacidad de oxidar Mn(II) en un sistema de tratamiento de aguas subterráneas como una estrategia para disminuir el lavado de las bacterias (Li *et al.*, 2016). Se han desarrollado diferentes métodos para inmovilizar los microorganismos para mejorar la efectividad del tratamiento del agua (Cruz *et al.*, 2013). Sin embargo, algunos de estos métodos pueden tener un costo muy alto y/o requerir una ejecución compleja. El método de biofilm proporciona una forma económica y sencilla de inmovilizar microorganismos en sistemas de tratamiento de aguas (Li *et al.*, 2013). Algunas bacterias con una fuerte capacidad de formación de biofilm se agregan junto con otros microorganismos los cuales pueden retenerse en el



biofilm. En este estilo de vida, todos los microorganismos están protegidos efectivamente de sustancias tóxicas o nocivas y del estrés ambiental, mejorando la adaptabilidad de los microorganismos al medio ambiente (Rickard *et al.*, 2004). Por lo tanto, la inoculación simultánea de cepas que oxidan Mn(II) y de bacterias formadoras de biofilms en un biofiltro es un método eficaz para eliminar los iones de Mn en las aguas subterráneas dado que las bacterias formadoras de biofilms promueven la inmovilización de bacterias oxidantes de Fe(II) y Mn(II) en sistemas de filtros, mejorando la eliminación de tales iones de las aguas subterráneas (Li *et al.*, 2016).

A escala real, la reducción del tiempo de puesta en marcha de los biofiltros se ha logrado mediante la inoculación de biomasa microbiana proveniente del lavado de los filtros de una planta de tratamiento con un proceso bien establecido de eliminación biológica de Fe(II) y Mn(II) y amonio (Štembal T. *et al.*, 2005). Además, se ha informado que la aceleración de los tiempos de maduración en plantas nuevas puede lograrse agregando arena proveniente de una planta en funcionamiento, cuyos granos están recubiertos de biofilms y de óxidos de Mn (MnOx), al medio filtrante (Burger *et al.*, 2008).

Las técnicas de inoculación han mostrado ser una solución a la problemática encontrada en la implementación del proceso BioCIS-UNR®. En diversas plantas a escala real tales como las denominadas: Planta de Penitenciaría, Corrientes; Planta Noroeste de Aguas Santafesinas, Planta para Bidones de Las Garzas, entre otras, donde la puesta en marcha para la remoción de Mn(II) era muy lenta, se logró que comenzaran a remover Mn(II) luego de la inoculación con arena madura, que presentaba MnOx y biofilms bacterianos, y con barros de lavado provenientes de plantas que funcionan desde hace años removiendo Mn(II) eficientemente. Sin embargo, se observó que esta técnica de inoculación no puede ser aplicada habitualmente ya que implica tener que parar el funcionamiento de las plantas para poder extraer las arenas y, además, algunas plantas son inaccesibles. Asimismo, las particularidades de cada planta hacen que estas metodologías presenten un alto grado de riesgo, debido a que no se cuenta con una base metodológica para su implementación.

## **2 Objetivos:**

### **2.1 Objetivo General:**

Generar nuevos conocimientos en relación a las comunidades microbianas involucradas en la remoción biológica de Mn de aguas de consumo humano, a fin de optimizar la implementación de los procesos biológicos existentes y extrapolarlos a nuevos procesos de biorremediación.

### **2.2 Objetivos Particulares:**

1) Conocer la comunidad bacteriana que participa en la remoción de Mn(II) en plantas de tratamiento de aguas de la provincia de Santa Fe. Aislar y seleccionar MOB y caracterizarlas a fin de obtener MOB con alta capacidad de oxidación Mn(II) y de formación de biofilms y adaptables a distintas condiciones ambientales.

2) Caracterizar microscópicamente relaciones entre los procesos de oxidación de Mn(II) y de formación de biofilms de las MOB aisladas que resulten de interés.

3) Con las MOB seleccionadas, realizar un ensayo de bioaumentación a escala de laboratorio para evaluar si mejoran la eficiencia de remoción de Mn de aguas subterráneas.

### 3 Estudio y Caracterización de Comunidades Bacterianas Oxidantes de Mn(II) Presentes en Plantas de Tratamiento de Aguas de la Provincia de Santa Fe

#### 3.1 Introducción

##### 3.1.1 Bacterias Oxidantes de Mn(II)

La oxidación de Mn(II) es llevada a cabo por una variedad de microorganismos. En particular, las MOB pertenecen a varios filos bacterianos, incluidos Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes y Proteobacteria. Dentro de estos filos, algunos aislados caracterizados incluyen *Aurantimonas manganooxydans* SI85-9A1, *Erythrobacter* sp. SD-21, *Leptothrix discophora* SS-1, *Pedomicrobium* sp. ACM 3067, *Escherichia coli*, *Hyphomicrobium* sp., cepas MnB1 y GB-1 de *Pseudomonas putida*, *Roseobacter* sp. AzwK-3b, *Bacillus* sp. SG-1, *Ralstonia* sp., *Variovorax* sp., *Rhodobacter* sp., *Marinobacter* sp., *Albidiferax* sp. TB-2, *Crenothrix* sp., *Hydrogenophaga* sp., *Cupriavidus* sp. y *Rhizobium* sp. (Hansel y Learman, 2016; Tebo *et al.*, 2005).

Durante la reacción, las bacterias convierten el Mn(II) a óxido de Mn(III) o Mn(IV) a través de las oxidasas de Mn(II) (Tebo *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2015). Entre las oxidasas de Mn(II) conocidas se incluyen las multicobre-oxidasas (MCO) y la hemo-peroxidasas (Anderson *et al.*, 2009a; Geszvain *et al.*, 2016). Las MCO son una clase de proteínas con cuatro átomos de cobre como cofactor de la enzima. Las MCO más estudiadas son MnxG (cepa SG-1 de *Bacillus* sp.) (Dick *et al.*, 2008), CumA (cepa GB-1 de *Pseudomonas putida*) (Francis y Tebo, 2001), MoxA (cepa ACM 3067 de *Pedomicrobium* sp.) (Ridge *et al.*, 2007), MofA (cepa SS-1 de *Leptothrix discophora*) (Corstjens *et al.*, 1992) y CotA (cepa WH4 de *Bacillus pumilus*) (Su *et al.*, 2013). Asimismo, se ha demostrado que CueO, la MCO de *E. coli*, oxida Mn(II) *in vitro*, y una cepa que sobreexpresa CueO posee la capacidad de eliminar Mn(II) (Su, J., *et al.*, 2014).

Por otro lado, se han identificado peroxidasas de Mn(II) en las alfa-proteobacterias *Aurantimonas manganooxydans*, en la cepa SD-21 de *Erythrobacter* sp. (Anderson *et al.*, 2009b), y en la cepa Azwk-3b de *Roseobacter*

sp. (Andeer *et al.*, 2015). Recientemente se mostró que la cepa GB-1 de *P. putida*, puede oxidar Mn(II) usando MCO, y que también contiene una peroxidasa de Mn(II) que puede catalizar la oxidación de Mn(II) (Geszvain *et al.*, 2016). Esta fue la primera observación de una bacteria oxidante Mn(II) que utiliza ambos tipos de enzimas (Geszvain *et al.*, 2016).

Se ha confirmado que la cepa productora de cápsula de *L. discophora* SP-6 secreta la oxidasa de Mn(II) (Emerson y Ghiorse, 1992), y con *P. putida* GB-1, *Erythrobacter* sp. SD-21 (Johnson y Tebo, 2008) y *A. manganoxydans* SI85-9A1 (Anderson *et al.*, 2009a; Anderson *et al.*, 2009b) la oxidasa de Mn(II) ha sido identificada como una proteína soluble que reside en el periplasma o está asociada libremente con la superficie de la célula.

En la formación de esporas de *Bacillus* sp. SG-1, se descubrió que la oxidasa de Mn(II) se localiza en el exosporio, que es la capa más externa de la espora (Francis *et al.*, 2002). El intento de identificar la oxidasa de Mn(II) específica no tuvo éxito con la SG-1, pero sí en otras dos especies de *Bacillus* oxidantes de Mn(II), PL-12 y MB-7, y se confirmó que estaban localizadas en el exosporio (Dick *et al.*, 2008). Cuando se intentó purificar la oxidasa de Mn(II) de *Erythrobacter* sp. SD-21, el EPS impidió la purificación completa de la proteína (Johnson y Tebo, 2008). De esta manera, sólo tres oxidasas de Mn(II) han sido exitosamente caracterizadas hasta el momento (Su *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015).

Algunas de las funciones biológicas de la oxidación de Mn(II) propuestas son: protección contra metales pesados tóxicos, especies reactivas del oxígeno o luz UV (Ghiorse, 1984); almacenamiento de un aceptor de electrones para su uso posterior en la respiración anaeróbica (Tebo, 1983); o la descomposición de la materia orgánica refractaria en sustratos utilizables (Sunda y Kieber, 1994). Esto último se debe a la alta capacidad oxidante que tienen los óxidos de Mn, por lo cual facilitarían los pasos previos de oxidación y utilización de la materia orgánica compleja. También existen evidencias que sugieren que las bacterias pueden aprovechar y utilizar la energía de la reacción de oxidación de Mn(II) a Mn (III, IV) (Kepkay y Nealson, 1987) porque es termodinámicamente favorable. Sin embargo, se necesitan más trabajos de investigación para resolver todas estas hipótesis.

### 3.1.2 Hábitats de MOB

Las MOB son ubicuas en la naturaleza; se pueden aislar de casi cualquier lugar. Los hábitats que contienen altos niveles de Mn y aquellos en los que el ciclo de Mn es un proceso activo generalmente tienden a tener un alto número de estas bacterias (Gottfreund y Schweisfurth, 1983; Schuett y Ottow, 1977).

Se conocen algunos casos donde una gran cantidad de microorganismos similares resultan visibles y estrechamente asociados con los óxidos de Mn, y, en tales condiciones, es más fácil concluir que los organismos observados participaron en la formación de los precipitados metálicos. Tal es el caso de depósitos de ferromanganeso en tuberías hidroeléctricas a partir de los cuales se recuperaron especies de *Hyphomicrobium* (Tyler y Marshall, 1967). Asimismo, Ghiorse y colaboradores (Ghiorse, 1984) observaron y aislaron especies de *Leptothrix* como el agente causante de las películas superficiales de Mn en un lago de poca profundidad. En otros casos, es posible aislar fácilmente MOB de algún material, aunque éstas no son tan abundantes ni tan obviamente responsables de los precipitados observados. Además, el aislamiento de una MOB indica el "potencial" para la oxidación de Mn en lugar de la "demostración" de la participación directa con la precipitación de metales en la naturaleza. Dado que tantos organismos son capaces de oxidar Mn (y por tantos mecanismos diferentes), se debe tener precaución en la interpretación de reportes de alto número de oxidantes de Mn. Otro punto importante es que los métodos químicos utilizados para identificar los óxidos de Mn son muy sensibles, y puede ser que muchos organismos que se identifican como oxidantes de Mn en el cultivo nunca acumulen tales precipitados en la naturaleza (Nealson, 2006).

### 3.1.3 Cultivo de MOB

Las MOB pueden obtenerse fácilmente en cultivos puros y crecer bien en medios líquidos o sólidos, siempre que se evite la toxicidad del Mn(II). A continuación, se discuten algunos de los principios generales que deben considerarse para el crecimiento de los oxidantes de Mn.

-Fuente de carbono: las fuentes de carbono simples (acetato, succinato, glicerol, etc.) se usan generalmente para aislar MOB; para muchos de estos organismos, la oxidación de Mn en el cultivo se produce en la fase estacionaria de crecimiento. Además, algunas fuentes de carbono disminuyen el pH del medio

o reprimen la capacidad de oxidación de Mn (Nealson, 2006). Muchos de los medios utilizan niveles muy bajos de carbono, y en algunos medios los aminoácidos sirven como la única fuente de carbono orgánico. Con los organismos recién aislados, se suele probar de forma rutinaria varias fuentes de carbono para determinar la capacidad que poseen los mismos de crecer y oxidar Mn.

-pH: dado que la oxidación de Mn es fuertemente dependiente del pH, es importante controlar el pH del medio. Mediante la adición de un buffer que regule cerca de la neutralidad, se puede evitar la oxidación indirecta del Mn debido a los cambios de pH. Rutinariamente se suele agregar 10–100 mM de buffer Hepes a un pH de 7,0 – 8,0.

-Vitaminas: En general, las MOB no son difíciles de cultivar, aunque muchos medios de cultivo contienen un suplemento vitamínico o pequeñas cantidades de extracto de levadura al medio.

-Fuente de Mn: el tipo de sal de Mn(II) utilizada (por ejemplo, acetato, carbonato, cloruro, sulfato, etc.) es indistinto. Sin embargo, es recomendable filtrar y esterilizar la solución de Mn(II) y agregarla al medio después del autoclave. El autoclave puede conducir a la oxidación parcial y la formación de partículas de óxido de Mn que luego pueden unirse al Mn(II) y catalizar su oxidación abiótica. En medios ricos, se puede agregar Mn en concentraciones relativamente altas (es decir, milimolar) sin causar toxicidad. Sin embargo, a medida que el medio se vuelve menos rico y hay menos compuestos orgánicos para quelar el Mn(II), se debe disminuir la concentración de Mn para evitar la inhibición del crecimiento. Con organismos recién aislados, se realizan pruebas rutinarias de crecimiento en medios con Mn en concentraciones de 10 - 100  $\mu$ M.

El objetivo de este trabajo fue encontrar MOB cultivables autóctonas y nuevas cuyo último fin sea el desarrollo de un inóculo bacteriano aplicable para acelerar y mejorar la eliminación de Mn en plantas de tratamiento de aguas subterráneas. Virtualmente, todos aquellos sistemas de filtración biológica que se han expuesto a aguas con diferentes concentraciones de Mn y que actualmente funcionan removiendo eficientemente este metal, contienen MOB y, como hipótesis de trabajo, se consideró efectivo recuperar tales bacterias nativas. Por lo tanto, se evaluaron los microbiomas de dos plantas de tratamiento

biológico de aguas subterráneas de nuestra región que actualmente eliminan Mn(II) con alta eficiencia, una ubicada en Las Toscas (LT) y la otra en Villa Ocampo (VO). En ambas plantas, la línea de tratamiento comprende una etapa de aireación, seguida por dos etapas de filtración: una en un pre-filtro ascendente (PF) compuesto por un lecho de grava y otra en un filtro rápido convencional de lecho de arena (Pacini *et al.*, 2014). Además, se seleccionaron y aislaron MOB que luego fueron evaluadas en función de sus capacidades de oxidación de Mn(II) y de formación de biofilm. Posteriormente, mediante el análisis de la capacidad para oxidar Mn(II) de manera adaptativa en un entorno cambiante y en aguas subterráneas, se determinó la versatilidad de las distintas MOB caracterizadas, algunas de las cuales tendrían la capacidad de sobrevivir bajo condiciones adversas y evitar los problemas a los que se enfrentaría un microorganismo exógeno cuando es inoculado por bioaumentación. En general, estos estudios permitieron la selección de candidatos bacterianos potencialmente aplicables para el desarrollo de futuras estrategias para la optimización de los procesos de eliminación de Mn(II) de aguas subterráneas.

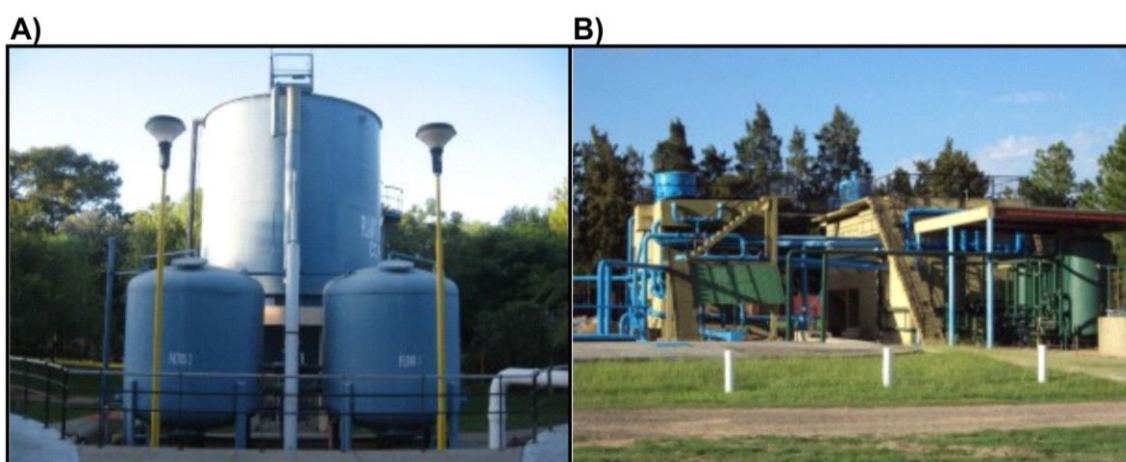
## **3.2 Materiales y Métodos:**

### **3.2.1 Recolección de Muestras**

Se tomaron muestras de dos plantas de filtración biológica a gran escala ubicadas en las localidades de VO (28° 29' 20,8" Sur; 59° 20' 29,5" Oeste) y LT (28° 21' 28,2" Sur; 59° 15' 48,2" Oeste), en la provincia de Santa Fe, Argentina. La planta de tratamiento de VO ha estado en funcionamiento desde el año 2011 y la planta de LT desde el 2013 y ambos sistemas fueron construidos usando la tecnología BioCIS-UNR® (Figura 3.1.). En ambas plantas, el tratamiento comprende una etapa de aireación, seguida de dos pasos de filtración: uno en un pre-filtro (PF) compuesto por un lecho de grava y luego en un filtro rápido convencional de lecho de arena (F) (Pacini *et al.*, 2014).

Las muestras de agua subterránea se recolectaron de la cisterna principal que contiene el agua de entrada antes de la unidad de aireación. Los datos de calidad del agua subterránea y de los efluentes del agua tratada se obtuvieron a través de una colaboración con las comunas de las plantas de VO y LT:

Cooperativa de Servicios Las Toscas (CODELSELT) y Cooperativa Telefónica Villa Ocampo Ltda. (COTELVO), y del CIS, utilizando métodos estándar (Rice *et al.*, 2017). Las muestras de biofilms y precipitados de Mn acumulados sobre el material filtrante, la grava (20 a 30 mm) de los pre-filtros y la arena (0,9 a 1,0 mm) de los filtros, se recolectaron en botellas de polietileno estériles. Los materiales recolectados utilizados para cultivar y aislar bacterias se pusieron inmediatamente en hielo y luego se conservaron a 4 °C hasta su uso. Parte del material se utilizó para extracciones de ADN; y en este caso, las muestras se congelaron inmediatamente en Nitrógeno líquido y se mantuvieron congeladas hasta su uso.



**Figura 3.1. Plantas de tratamiento de remoción biológica de Mn de aguas.**

**A) Planta de tratamiento de Villa Ocampo.** El proceso de tratamiento consiste en un paso de aereación seguido de una doble filtración biológica (Proceso BioCIS-UNR®). Se inauguró en el año 2013. Caudal Tratado: 120 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>. Abastece a una población de 22.000 habitantes.

**B) Planta de tratamiento de Las Toscas.** El proceso de tratamiento consiste en un paso de aereación seguido de una doble filtración biológica (Proceso BioCIS-UNR®). Se inauguró en el año 2011. Caudal Tratado: 100 - 150 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>. Abastece a una población de 14.000 habitantes

### 3.2.2 Procesamiento de las Muestras

#### 3.2.2.1 Extracción de ADN de Muestras de Arena

Se utilizaron 10 g de arena por muestra para la extracción de ADN genómico microbiano que se realizó con el kit PowerMax Soil DNA® (MOBIO Lab., Inc., Cat: 12888-50), siguiendo las indicaciones del fabricante. La calidad del material extraído fue analizada mediante electroforesis en geles de agarosa



0,8 %. Para la cuantificación se realizó el ensayo Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Cat: P7589), según el protocolo del fabricante.

### **3.2.2.2 Preparación de la Biblioteca de Genes 16S ARNr**

La biblioteca de genes 16S ARNr se realizó según el procedimiento descrito en la Guía de preparación de muestras 16S de Illumina. Brevemente, para la preparación de la biblioteca, se amplificó la región V3 y V4 del gen 16S ARNr a partir de 12,5 ng de ADN. Esta región del gen 16S ARNr se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (95 °C durante 3 min, seguido de 25 ciclos a 95 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s, seguido de una extensión final a 72 °C durante 5 min) usando los cebadores universales: 341F (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGG CWGCAG-3') y 805R: (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG GACTACHVGGGTATCTAATCC-3').

Las PCR se realizaron por triplicado, lo que significa que cada muestra se amplificó en 3 réplicas de reacciones de PCR de 25 µL que contenían 2,5 µL de ADN (5 ng µL<sup>-1</sup>), 5 µL de cada cebador (1 µM) y 12,5 µL de 2X KAPA HiFi HotStart ReadyMix. Las tres muestras amplificadas se agruparon en un solo volumen (75 µL) y se purificaron con perlas magnéticas utilizando el kit AMPure XP (Beckman Coulter Life Sciences, Indianápolis, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del manual de uso.

A continuación, se usaron 5 µL de ADN purificado para la segunda PCR con los cebadores de los índices Nextera XT (N7xx y S5XX). El programa para esta PCR es el mismo que para la PCR del 16S ARNr, con la salvedad de que solo se realizan 8 ciclos de amplificación. La mezcla de 50 µL de PCR contenía, además del ADN purificado, 5 µL de cada cebador (1 µM), 25 µL de 2 KAPA HiFi HotStart ReadyMix y 10 µL de agua de calidad PCR. Se realizó una segunda purificación con el kit AMPure XP (Beckman Coulter Life Sciences, Indianápolis, EE. UU.) para purificar el ADN resultante. Se cuantificó la concentración de la biblioteca utilizando el kit de ensayo Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE. UU.) según el protocolo del fabricante y se desnaturalizó con NaOH antes de la secuenciación en la plataforma Illumina MiSeq (Illumina, Inc.).

### 3.2.2.3 Secuenciación y Asignación Taxonómica

El procesamiento previo de los datos de secuencias, la clasificación y la asignación taxonómica se realizaron como se describió anteriormente (Piñero *et al.*, 2017). Brevemente, el control de calidad de las lecturas se realizó con FastQC v0.11.5 5 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) y multiQC (<http://multiqc.info/>). La unión de las lecturas se realizó utilizando el software PEAR (<http://sco.h-its.org/exelixis/web/software/pear/>). El filtrado de las lecturas por calidad y longitud se realizó con los programas FASTQX-Toolkit ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/)) y BBMap (<https://sourceforge.net/projects/bbmap/>). Las secuencias FASTQ concatenadas y filtradas se convirtieron al formato FASTA y se eliminaron las secuencias que contienen "N". Para eliminar las secuencias identificadas como quimeras, se utilizó el software VSEARCH (<https://github.com/torognes/vsearch>) tomando como referencia la base de datos del Proyecto Ribosome Database (RDP; <https://rdp.cme.msu.edu/>). Las secuencias restantes se agruparon en unidades taxonómicas operativas (OTU) a un nivel de similitud del 97 % con una estrategia de referencia abierta implementada en QIIME (<http://qiime.org/>), utilizando SortMeRNA (<http://bioinfo.lifl.fr/RNA/sortmerna/>) para la selección de referencia contra la base de datos SILVA (v119) y SUMACLUST (<https://git.metabarcoding.org/obitools/sumatra/wikis/home>) para la selección del OTU. La clasificación taxonómica se implementó utilizando la taxonomía asignada por el script incluido en QIIME. Esto fue realizado por el servicio del Instituto de Agrobiotecnología Rosario (<https://www.indear.com/>). Las secuencias de Illumina se depositaron en la base de datos SRA que está disponible en NCBI con el siguiente acceso: PRJNA514808.

### 3.2.3 Selección y Aislamiento de MOB

Se tomaron porciones representativas de material filtrante (5 g), se resuspendieron en 50 mL de solución isotónica estéril de NaCl 15 mM y se vortexearon vigorosamente para disgregar los biofilms bacterianos. Posteriormente, se prepararon diluciones adecuadas de estas suspensiones ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) y se plaquearon 0,1 mL de cada dilución en tres medios de cultivo diferentes. Los medios de cultivo utilizados para el proceso de selección y aislamiento se describen en la tabla 3.1.

**Tabla 3.1. Medios de cultivo para la selección y aislamiento de MOB.**

Medio de Cultivo	Composición	Referencia
Medio-PC	Extracto de levadura 0,05 g L <sup>-1</sup>	(Tyler y Marshall, 1967)
Medio-Mn	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 3,7 µM; peptona 2,0 g L <sup>-1</sup> ; extracto de levadura 0,5 g L <sup>-1</sup> ; buffer Hepes 10 mM pH=7,5	(Stein <i>et al.</i> , 2001)
Medio-Lept	Extracto de levadura 0,5 g L <sup>-1</sup> ; casaminoácidos 0,5 g L <sup>-1</sup> ; glucosa 5 mM; CaCl <sub>2</sub> 0,48 mM; MgSO <sub>4</sub> 0,83 mM; FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 3,7 µM; Hepes 10 mM pH=7,5; ZnSO <sub>4</sub> 0,15 µM; CoCl <sub>2</sub> 0,08 µM; Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 0,06 µM).	(Boogerd y de Vrind, 1987)

Los medios de cultivo para el aislamiento de bacterias provenientes de las muestras de VO se prepararon utilizando agua subterránea de VO y los medios para el aislamiento de bacterias a partir de muestras de LT se prepararon con agua subterránea de LT, en lugar de agua destilada. Se tuvo en cuenta que el agua subterránea de LT contiene 8 µM de Mn(II) (~ 0,43 mg L<sup>-1</sup>) y el agua de VO contiene 6 µM de Mn(II) (~ 0,33 mg L<sup>-1</sup>) (Tabla 3.3.), y se suplementó con MnSO<sub>4</sub> para alcanzar una concentración final de 100 µM. Las placas se incubaron a 28 °C y se examinaron periódicamente hasta observar la aparición de colonias con centros o bordes oscuros como se evidencian los depósitos de óxidos de Mn. Las colonias oscuras identificadas fueron aisladas y plaqueadas en el mismo medio, suplementado o sin suplementar con MnSO<sub>4</sub> 100 µM, para confirmar que en ausencia de Mn las colonias de MOB perdían tal coloración. Posteriormente se tiñeron las colonias oscuras con el colorante azul de Leucoberbelina (Leucoberbelin Blue, LBB), preparada en 45 mM de ácido acético en una concentración 0,04 % p/v. En presencia de Mn(III) o Mn(IV), la LBB es oxidada produciendo un color azul (Krumbein y Altmann, 1973; Tebo *et al.*, 2007b) y este test se utilizó para confirmar que el color oscuro de las colonias correspondía específicamente a óxidos de Mn (Figura 3.4.).

### 3.2.3.1 Conservación de Cepas

Cultivos en medio LB líquido (Bertani, 1951) de colonias individuales de cada aislamiento seleccionado fueron guardadas mediante crioconservación. Se vertieron 800 µL de tales cultivos en tubos tipo eppendorf estériles de 1,5 mL de

capacidad y se adicionaron finalmente 200  $\mu$ L de glicerol estéril en cada tubo, como agente crioprotector. Cada tubo se identificó correctamente y se depositó en una caja de cartón, dividida en compartimentos internos para ser almacenados en freezer a  $-70^{\circ}$  C. La construcción de este cepario se realizó para permitir la utilización de las MOB en futuras investigaciones, adquiriendo un especial interés los estudios vinculados con la formulación de inóculos para ensayos de remoción de Mn de aguas.

### 3.2.3.2 Identificación Molecular de las MOB Cultivadas

Se picaron colonias aisladas de las cepas seleccionadas y se resuspendieron en 30  $\mu$ L de agua destilada estéril para luego ser calentadas durante 8 min a  $94^{\circ}$  C. Se tomaron alícuotas de 5  $\mu$ L como templado para realizar la amplificación por PCR del gen 16S ARNr usando el par de oligonucleótidos universales FD1 y RP1 (Clarridge, 2004). Las secuencias de oligonucleótidos utilizadas para la identificación molecular de los aislados obtenidos durante este trabajo de tesis se detallan en la tabla 3.2.

**Tabla 3.2. Oligonucleótidos para la identificación de MOB.**

Nombre	Secuencia 5'3'	Referencia
fD1	ccgaattcgtcgacaacAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	(Clarridge, 2004)
rP1	cccgggatccaagcttACGGTTACCTTGTTACGACTT	(Clarridge, 2004)

Los productos de amplificación (1500 pb) se purificaron con el kit Wizard® SV Gel y PCR Clean-Up System (Promega) y se secuenciaron mediante la secuenciación Sanger en la Universidad de Maine, Estados Unidos. Se obtuvieron las secuencias de ambas hebras del gen 16S ARNr y se utilizó el módulo Seq-Builder del paquete de software Lasergene 7 DNASTAR (Burland, 2000) para convertir las secuencias reversas en secuencias reversas complementarias. Las mismas se alinearon con las secuencias Forward utilizando el módulo MegAlign del mismo paquete (Burland, 2000). Las secuencias de nucleótidos consenso obtenidas luego del alineamiento se compararon con las secuencias del gen 16S ARNr depositadas en la base de datos SILVA para determinar las identidades de las bacterias.

### 3.2.3.3 Análisis por MALDI-TOF MS

Se realizó la identificación bacteriana a nivel de especie basada en la espectrometría de masas, específicamente en el MALDI-TOF MS, por su sigla en inglés matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer (Dingle y Butler-Wu, 2013; Welker y Moore, 2011). Este ensayo se realizó en colaboración con el Laboratorio de Microbiología del Centro de Especialidades Médicas Ambulatorias de Rosario (CEMAR). El equipamiento MALDI-TOF se utiliza para la identificación rápida, segura y confiable de microorganismos aislados de muestras clínicas. La identificación se realizó a partir de una colonia aislada de los microorganismos de interés, las cuales se extendieron con un palillo de forma separada sobre una placa de metal pulido re-utilizable. Esta placa permite la aplicación de 96 muestras para ser analizadas en una misma corrida. Sobre cada colonia se aplicó 1  $\mu$ L de ácido fórmico al 70 % para lisar las bacterias y luego se añadió 0,5  $\mu$ L de una solución de matriz MALDI (70/30 de acetonitrilo/agua), la cual se cristalizó dejándose secar a temperatura ambiente. Esta matriz cumple dos roles fundamentales; primero expone las proteínas intracelulares mediante la ruptura de la membrana celular y segundo, facilita la vaporización y la ionización de las proteínas mediante un haz de laser pulsante. Una vez ionizadas estas proteínas viajan por una cámara de vacío siendo detectadas al final (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Dependiendo de la relación masa/carga de cada fragmento será el tiempo que ésta demore en llegar al final. Este "tiempo de vuelo" es utilizado para construir el espectro específico de las masas. Dado que un microorganismo analizado en el MALDI-TOF MS entregará siempre el mismo espectro de masas, se han diseñado archivos con los espectros de masas de la fragmentación de péptidos y proteínas que presentan los distintos microorganismos para una misma emisión del láser y una misma distancia de migración.

Los espectros generados fueron analizados utilizando el software FlexControl (version 3.4) para realizar la identificación. Los espectros se analizaron con el software BioTyper (versión 471 3.1.66; Bruker) y la base de datos MBT DB-5627 provista por el fabricante. Para la identificación por MALDI-TOF MS a nivel de especie, se consideraron aquellos con un score  $\geq 2.0$ .

### 3.2.4 Caracterización de las MOB Seleccionadas

#### 3.2.4.1 Ensayos de Oxidación de Mn(II)

Se cuantificó la oxidación de Mn(II) en medio sólido, usando el colorante LBB, tal como se describió previamente (Geszvain *et al.*, 2011; Krumbein y Altmann, 1973; Tebo *et al.*, 2007a) con las siguientes modificaciones. Se crecieron las bacterias en medio LB líquido con agitación hasta crecimiento exponencial y luego se realizaron diluciones hasta una densidad óptica de 0,1 a 600nm ( $DO_{600}=0,1$ ) en el mismo medio. Gotas de 20  $\mu$ L de las diluciones de cada cultivo se plaquearon en el medio apropiado conteniendo  $MnSO_4$  100  $\mu$ M. Como control, se usaron placas sin Mn(II) en el medio de cultivo. A diferentes tiempos (días), las células provenientes de una gota fueron removidas con un ansa y resuspendidas en 1 mL de buffer Hepes 10 mM (pH=7,5). Para cuantificar los óxidos de Mn producidos, se agregaron 500  $\mu$ L de una solución de LBB 0,04 % (p/v) en 45 mM de ácido acético. Las muestras se vortexearon durante 30 s y se centrifugaron 5 min a 6000 g para remover las células. Luego, se midió la absorbancia a 618 nm de los sobrenadantes usando un Synergy Reader, BioTek.

Para relativizar las medidas entre las diferentes bacterias, cada pellet celular fue lavado con buffer Hepes 10 mM (pH=7,5), resuspendido en 1 mL del mismo buffer conteniendo PMSF 1 mM, sonicado, y las proteínas totales fueron medidas por el método Bradford (Bradford, 1976). La capacidad de oxidación de Mn se calculó como  $OD_{618nm}/\text{concentración de proteínas totales (mg mL}^{-1}\text{)}$ . Se realizaron cuatro experimentos independientes y en las figuras se observan los valores promedios y desvíos estándar (DS). Los datos se analizaron estadísticamente haciendo ANOVA ( $p < 0,05$ ). Estos ensayos se realizaron a diferentes temperaturas de crecimiento (18 °C, 28 °C y 37 °C) y variando la concentración inicial de Mn(II) (100  $\mu$ M, 150  $\mu$ M y 200  $\mu$ M). Además se evaluó la cuantificación de la oxidación de Mn(II) en presencia del ion metálico Fe(II) suplementado al medio de cultivo estándar (Mn(II) 100  $\mu$ M) en concentraciones 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M y 100  $\mu$ M.

#### **3.2.4.2 Crecimiento Bacteriano**

Se crecieron las bacterias como se describe previamente (ensayos de oxidación de Mn(II)) en el medio apropiado conteniendo MnSO<sub>4</sub> 100 µM. Como control, se usaron placas con medio de cultivo sin Mn(II). A diferentes tiempos (días) se removieron las células provenientes de una gota con un ansa y se resuspendieron en 1 mL de NaCl 15mM, se realizaron diluciones seriadas, y se plaquearon en placas de medio PC sólido. Se eligió este medio de cultivo porque las colonias alcanzan un menor tamaño y crecen de forma más definida, facilitando el recuento de las mismas. Se realizaron recuentos de colonias a diferentes tiempos de incubación a 28 °C, y los resultados se presentan como log UFC mL<sup>-1</sup>.

#### **3.2.4.3 Ensayos de Formación de Biofilm**

Para los ensayos de formación de biofilm, los cultivos de bacterias crecidas en medio LB con agitación hasta fase de crecimiento exponencial fueron diluidos 1:10 en el mismo medio de cultivo. Se colocó un total de 2 mL de solución bacteriana diluida, con o sin MnCl<sub>2</sub> 100 µM, en tubos de ensayo y se incubaron estáticamente a 28 °C. A diferentes tiempos, se cuantificaron los biofilms por tinción con cristal violeta (CV) como se describió previamente (Zimaro *et al.*, 2014). Todos los ensayos fueron realizados al menos por triplicado para ambas condiciones, con y sin Mn. Los valores expresados representan el promedio de tres tubos para cada cepa; los datos fueron analizados estadísticamente usando ANOVA (p <0,05).

#### **3.2.4.4 Ensayos de Interacción en el Crecimiento entre MOB**

Se estudiaron interacciones en el crecimiento entre diferentes cepas como se describe previamente (Li *et al.*, 2016). Brevemente, 100 µL de un cultivo en fase estacionaria de cada cepa fue plaqueado en medio LB agar. Se dejaron secar los cultivos sobre el agar y por encima se colocaron gotas de cultivos en fase estacionaria del resto de las cepas bacterianas. Se incubaron estáticamente a 28 °C por 24 – 48 h. La inhibición del crecimiento de una bacteria por otra fue determinanda por el diámetro del halo de inhibición alrededor de cada gota.

### **3.2.4.5 Cuantificación de la Oxidación de Mn(II) en Agua Efectuada por MOB Inmovilizadas en Arena**

Se crecieron las bacterias hasta fase de crecimiento estacionaria en medio LB. Las mismas fueron centrifugadas y resuspendidas en el mismo medio. Posteriormente, se incubaron 50 mL de cada una de estas suspensiones bacterianas en presencia de 80 g de arena estéril de un tamaño de 0,9-1,0 mm (similar a la arena usada en los sistemas de filtración biológicos de agua BioCIS-UNR®) en frascos Erlenmeyer de 1 L por 5 d. Luego, se removió el LB, las arenas se lavaron cuatro veces con agua estéril y se agregaron 50 mL de agua cruda de VO estéril, suplementada con  $\text{MnCl}_2$  hasta una concentración final igual a 100  $\mu\text{M}$ . Al cabo de 7 d de incubación se midió la oxidación de Mn(II) por el ensayo con LBB a 30 °C. Se utilizaron como control muestras de arena estéril sin inocular. La concentración de  $\text{MnOx}$  se determinó usando una curva de calibración que fue generada con distintas concentraciones conocidas de Mn(IV) ( $\text{KMnO}_4$ ) a las cuales se les adicionó un volumen constante de LBB y posteriormente se determinó su absorbancia a 618nm. Se realizaron tres experimentos independientes. Se analizaron los datos estadísticamente usando ANOVA ( $p < 0,05$ ).

## **3.3 Resultados**

### **3.3.1 Análisis Físico-químico de las Aguas de Las Toscas y Villa Ocampo**

Los sistemas de filtración biológica de Fe y Mn de LT y VO actualmente funcionan eficientemente para la remoción de ambos metales utilizando los microorganismos que naturalmente están presentes en las respectivas aguas subterráneas, constituyendo buenos sistemas para asilar MOB.

Se recolectaron muestras tanto de las aguas subterráneas como de los respectivos efluentes primarios de las plantas de tratamiento de LT y VO a fin de analizar los parámetros físico-químicos de las mismas. Las características básicas de las dos aguas crudas influentes se listan en la Tabla 3.3. El análisis mostró que ambas aguas crudas poseían un pH ligeramente ácido, y presencia de Fe y Mn. El contenido de Fe fue de  $1,27 \pm 0,08$  y  $1,61 \pm 0,06 \text{ mg L}^{-1}$  en el caso



del agua cruda de LT y VO, respectivamente. Posterior al tratamiento (Efluente Planta) los valores de Fe son de  $0,11 \pm 0,03$  y  $0,13 \pm 0,04$  mg L<sup>-1</sup> en LT y VO, respectivamente, valores que están dentro de los límites de concentraciones de Fe en aguas permitidos de nuestra provincia (Tabla 1.1.). El contenido de Mn fue de  $0,43 \pm 0,05$  y  $0,33 \pm 0,07$  mg L<sup>-1</sup> en el caso de agua cruda de LT y VO, respectivamente. Luego de la filtración (Efluente Planta) los valores de Mn son de  $0,049 \pm 0,001$  y  $0,053 \pm 0,001$  mg L<sup>-1</sup> en LT y VO, respectivamente, correspondiendo también a valores que están dentro de los límites de concentraciones de Mn en agua permitidos de nuestra provincia (Tabla 1.1.).

Las principales diferencias entre ambas calidades de agua subterránea fueron una mayor concentración de sulfato, fluoruro y sodio en LT y amonio en VO (Tabla 3.3.). Actualmente, ambas plantas pueden eliminar con alta eficiencia el tanto el Mn y el Fe como el amonio presentes en las aguas crudas (Tabla 3.3.). Los otros parámetros físico-químicos no mostraron variación entre el agua subterránea cruda y las aguas del efluente (Tabla 3.1), pero están dentro de los límites aceptables establecidos por la ley Argentina (Ley No. 11,220 Anexo A). Debido a la alta eficiencia de remoción de Mn(II), ambas plantas fueron seleccionadas en este trabajo para el estudio de las comunidades bacterianas presentes y para el aislamiento de MOB.

**Tabla 3.3. Características físico-químicas del agua cruda y de los efluentes y rendimiento de las plantas de tratamiento de aguas de LT y VO.**

Parámetro	Agua cruda LT	Efluente Planta LT	Agua cruda VO	Efluente Planta VO
Temperatura (°C)	26±0,4	26±0,3	26±0,3	26±0,3
pH	6,6±0,2	6,5±0,2	6,4±0,1	6,6±0,1
Manganeso*(mg L <sup>-1</sup> )	0,43±0,05	0,049±0,001	0,33±0,07	0,053±0,001
Hierro*(mg L <sup>-1</sup> )	1,27±0,08	0,11±0,03	1,61±0,06	0,13±0,04
Amonio (mg L <sup>-1</sup> )	0,1±0,03	0,01±0,001	0,21±0,01	0,02±0,001
Nitrito (mg L <sup>-1</sup> )	0,006±0,001	0,006±0,001	0,006±0,001	0,006±0,001
Nitrato (mg L <sup>-1</sup> )	1,2±0,1	1,1±0,1	0,9±0,2	0,7±0,2
Sulfato (mg L <sup>-1</sup> )	304,0±0,8	302±0,9	49,0±0,9	51±0,9
Bicarbonato (mg L <sup>-1</sup> )	379±4	375±4	312±3	318±5
Fluoruro (mg L <sup>-1</sup> )	1,10±0,05	0,90±0,05	0,200±0,002	0,14±0,01
Sodio (ppm)	644±1	644±1	207±2	161±2
Cloruro (mg L <sup>-1</sup> )	476±2	202±7	405±5	200±7
Calcio (mg L <sup>-1</sup> )	85±6	81±4	131±4	136±5
Magnesio (mg L <sup>-1</sup> )	46±1	42±1	17,0±0,8	19±0,7

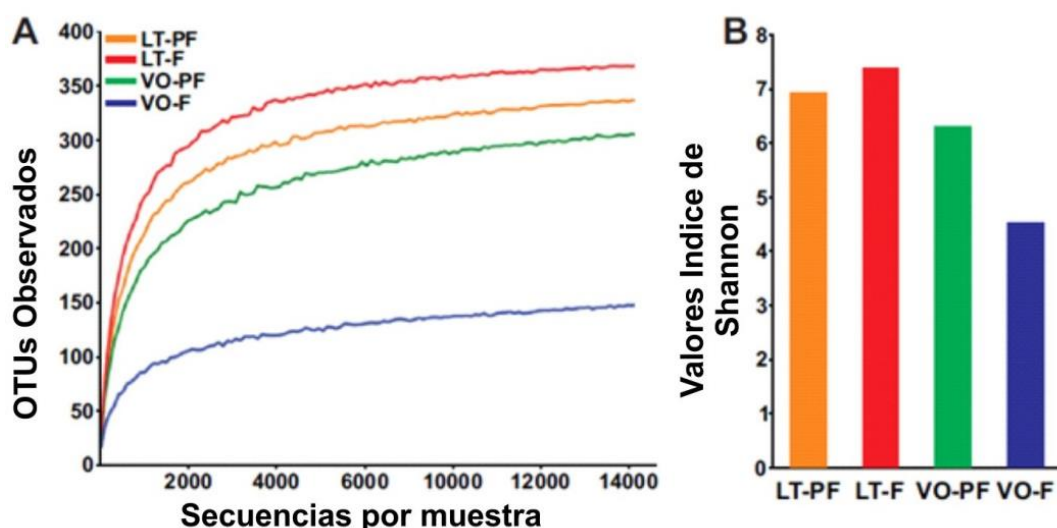
\*La concentración de Mn fue igual a 8  $\mu\text{M}$  y 6  $\mu\text{M}$  en el agua subterránea de LT y VO, respectivamente. La concentración de Fe fue igual a 23  $\mu\text{M}$  y 28  $\mu\text{M}$  en el agua subterránea de LT y VO, respectivamente.

### **3.3.2 Caracterización de la Diversidad Bacteriana Asociada a los Filtros de Remoción Biológica de Mn(II) de Las Toscas y Villa Ocampo**

En las plantas de tratamiento biológico, la eliminación de Mn(II) del agua puede realizarse tanto en el pre-filtro como en el filtro (Pacini *et al.*, 2005) . Es por ello que se recolectaron muestras de todas las etapas de filtración de las plantas de tratamiento de LT y VO y se caracterizaron las comunidades bacterianas presentes en estas muestras a través de la secuenciación masiva del gen 16S ARNr, mediante el sistema MiSeq de Illumina.

En este enfoque, las unidades taxonómicas operacionales (Operational Taxonomic Units, OTU), se definen como agrupaciones de variantes de secuencia similares de la secuencia del gen marcador 16S ARNr y cada uno de estos grupos pretende representar una unidad taxonómica de una especie o género de bacterias en función del umbral de similitud de secuencia. Normalmente, el OTU se define por un umbral de identidad del 97 % de las secuencias del gen 16S ARNr para distinguir las bacterias a nivel de género.

Las curvas de rarefacción de todos los microbiomas tendieron a una asíntota, indicando que la profundidad de la secuenciación fue suficiente para una exploración exhaustiva de las comunidades bacterianas presentes en estas fracciones. El pre-filtro de LT, el filtro de LT y el pre-filtro de VO tuvieron la mayor riqueza de especies, y las muestras del filtro de VO tuvieron la menor riqueza de especies de todas las comunidades bacterianas analizadas (Figura 3.2.A). El índice de Shannon reveló que la diversidad y la riqueza de la comunidad bacteriana resultaron ser filtro de LT > pre-filtro de LT > pre-filtro de VO > filtro de VO (Figura 3.2.B).

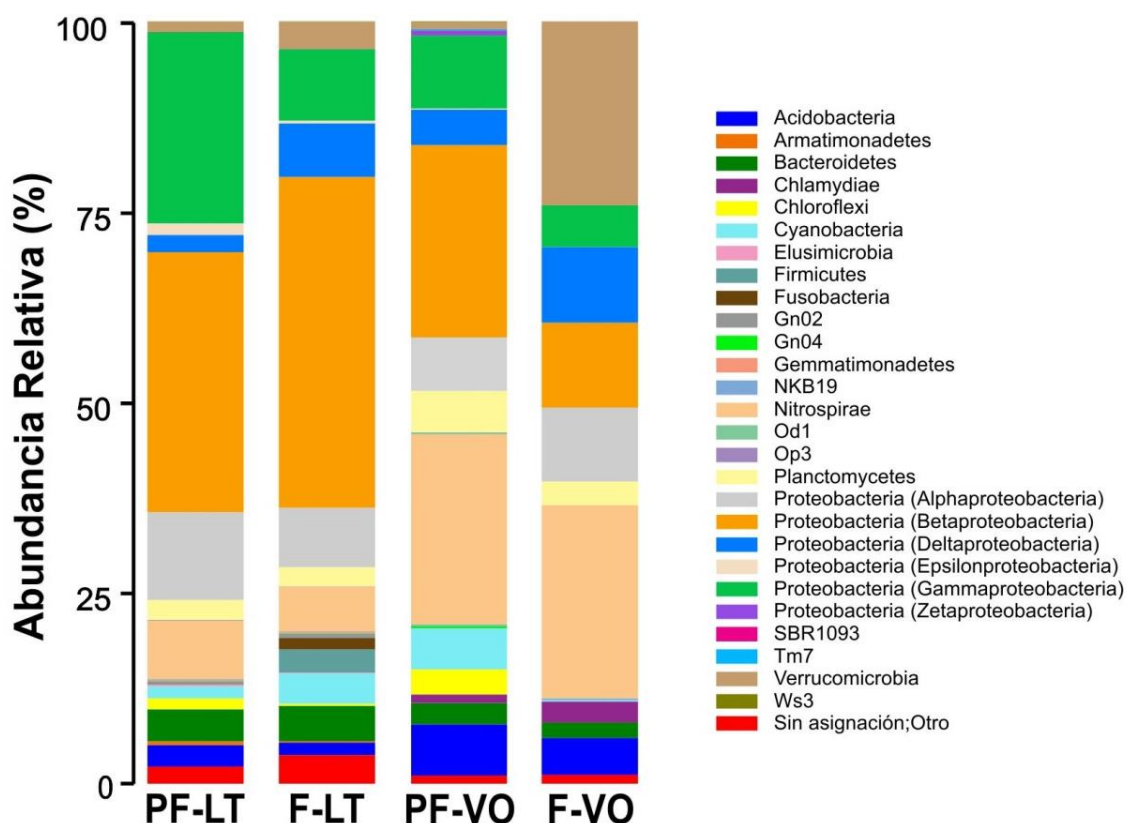


**Figura 3.2.  $\alpha$ -diversidad derivada de la secuenciación masiva del gen 16S ARNr de bacterias asociadas a muestras de las plantas de remoción de Mn(II) de LT y VO.**

Aquellas secuencias con similitud  $>97\%$  se trataron como unidades taxonómicas operativas y fueron consideradas como especies "estrechamente relacionadas". (A) Número de OTUs observados para el PF y F a partir de los microbiomas obtenidos de las Plantas de LT y VO (denominados PF-LT, F-LT, PF-VO y F-VO).

(B) La diversidad y riqueza bacteriana de cada muestra de LT y VO, estimadas por el índice de diversidad de Shannon a partir de los datos de OTU, fue más alta para las muestras de F-LT seguidas de PF-LT, PF-VO y el valor más bajo se observaron en F-VO.

Las OTU identificadas representaron a 27 filos bacterianos diferentes cuyas abundancias se pueden ver detalladas en la Figura 3.3 y en la Tabla 3.4. Tanto en LT como en VO, los grupos dominantes estuvieron afiliados con cuatro subclases de Proteobacterias: Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria y Deltaproteobacteria (Figura 3.3. y Tabla 3.4.). Además, en ambas plantas, Nitrospirae fue el segundo grupo más abundante. Los otros grupos encontrados estaban afiliados con los filos Acidobacteria, Firmicutes, Chloroflexi, Planctomycetes, Cyanobacteria y Bacteroidetes. Por otro lado, los filos Verrucomicrobia y Chlamydiae fueron abundantes en las muestras del filtro de VO (Figura 3.3. y Tabla 3.4.).



**Figura 3.3. Composición taxonómica de bacterias del pre-filtro de LT (PF-LT), filtro de LT (F-LT), pre-filtro de VO (PF-VO) y filtro de VO (F-VO).** La abundancia relativa de los diferentes filos se representa a lo largo del eje vertical con diferentes colores.

Los resultados que se describen en esta Figura, se realizaron en colaboración con la Lic. Lucila Ciancio, estudiante de Doctorado en Ciencias Biológicas.

**Tabla 3.4. Abundancia y distribución de todos los filos bacterianos encontrados en las muestras de PF-LT, F-LT, PF-VO y F-VO mediante la secuenciación masiva del gen 16S ARNr.**

Taxonomía	% PF LT	% F LT	% PF VO	%F VO
Sin asignación	2,3	3,8	1,1	1,2
Acidobacteria	2,8	1,6	6,7	4,8
Armatimonadetes	0,5	0,2	0,0	0,0
Bacteroidetes	4,2	4,6	2,8	2,0
Chlamydiae	0,0	0,0	1,1	2,8
Chloroflexi	1,4	0,3	3,3	0,0
Cyanobacteria	1,6	4,0	5,4	0,2
Elusimicrobia	0,2	0,1	0,0	0,0
Firmicutes	0,1	3,1	0,0	0,0
Fusobacteria	0,1	1,5	0,0	0,0
GN02	0,3	0,6	0,0	0,0
GN04	0,0	0,1	0,3	0,0
Gemmatimonadetes	0,1	0,2	0,0	0,0
NKB19	0,1	0,1	0,2	0,2

Nitrospirae	7,6	5,8	24,9	25,4
OD1	0,0	0,0	0,2	0,0
OP3	0,1	0,1	0,0	0,0
Planctomycetes	2,6	2,5	5,4	3,1
Proteobacteria (Alpha)	11,6	7,8	7,0	9,7
Proteobacteria (Beta)	34,1	43,4	25,2	11,1
Proteobacteria (Delta)	2,2	7,0	4,6	9,9
Proteobacteria (Epsilon)	1,5	0,4	0,1	0,0
Proteobacteria (Gamma)	25,1	9,4	9,6	5,5
Proteobacteria (Zeta)	0,0	0,0	0,5	0,0
SBR1093	0,0	0,0	0,1	0,0
TM7	0,0	0,0	0,2	0,0
Verrucomicrobia	1,4	3,5	0,9	24,1
WS3	0,0	0,1	0,1	0,0

El análisis basado en los perfiles de la comunidad bacteriana a nivel del género se detalla en la Tabla 3.5. Se reveló que una gran cantidad de OTUs, tanto de la planta de LT como de VO, correspondían a géneros bacterianos que previamente han sido descritos en la literatura como MOB tales como: *Pseudomonas* (Cerrato *et al.*, 2010; Geszvain *et al.*, 2016), *Crenothrix* (Cheng *et al.*, 2017), *Hydrogenophaga* (Marcus *et al.*, 2017), *Leptothrix* (Burger *et al.*, 2008; Hope y Bott, 2004), *Erythrobacter* (Francis y Tebo, 2001), *Hyphomicrobium* (Northup *et al.*, 2003), *Variovorax* (Stein *et al.*, 2001), *Rhodobacter* (Templeton *et al.*, 2005), *Sphingomonas* (Francis y Tebo, 2001), *Flavobacterium* (Akob *et al.*, 2014), *Acinetobacter* (Beukes y Schmidt, 2012; Tsuji *et al.*, 2017) y *Acidovorax* (Tsuji *et al.*, 2017). Además, bacterias conocidas que oxidan el Fe tales como *Gallionella* y *Rheinheimera* (Chen *et al.*, 2013; Fleming *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014), estuvieron presentes tanto en LT como en VO, en consonancia con la presencia de Fe(II) en ambas aguas subterráneas (Tabla 3.5.).

**Tabla 3.5. Abundancia y distribución de todos los géneros bacterianos encontrados en las muestras de PF-LT, F-LT, PF-VO y F-VO mediante la secuenciación masiva del gen 16S ARNr.**

Taxonomía	% PF LT	% F LT	% PF VO	%F VO
Sin asignación	2,1	3,8	1,1	1,2
<i>Paludibacter</i>	0,0	0,4	0,0	0,0
<i>Blvii28</i>	0,0	0,6	0,0	0,0
<i>Flectobacillus</i>	0,4	0,1	0,0	0,0
<i>Flavobacterium</i>	0,2	0,1	0,0	0,0
<i>Sediminibacterium</i>	0,6	0,2	0,5	0,1

<i>Haliscomenobacter</i>	0,2	0,3	0,1	0,0
<i>Parachlamydia</i>	0,0	0,0	0,1	0,0
<i>Rhabdochlamydia</i>	0,0	0,0	0,0	2,7
<i>Spirulina</i>	0,1	0,3	0,1	0,0
<i>Phormidium</i>	0,0	0,8	0,0	0,0
<i>Leptolyngbya</i>	0,0	0,0	0,2	0,0
<i>Acidaminobacter</i>	0,0	0,3	0,0	0,0
<i>Fusibacter</i>	0,0	1,3	0,0	0,0
<i>PSB-M-3</i>	0,0	0,7	0,0	0,0
<i>Nitrospira</i>	7,4	5,6	24,5	25,4
<i>GOUTA19</i>	0,1	0,0	0,4	0,0
<i>Gemmata</i>	0,1	0,0	0,1	0,0
<i>A17</i>	0,0	0,0	0,3	0,2
<i>Pirellula</i>	0,1	0,0	0,8	0,0
<i>Planctomyces</i>	0,9	0,8	0,7	1,3
<i>Phenylobacterium</i>	0,1	0,0	0,0	0,0
<i>Rhodoplanes</i>	0,0	0,0	0,1	0,1
<i>Methylosinus</i>	0,1	0,1	0,4	0,0
<i>Agrobacterium</i>	0,0	0,3	0,0	0,0
<i>Rhodobacter</i>	0,1	0,3	0,0	0,0
<i>Rubellimicrobium</i>	0,1	0,2	0,0	0,0
<i>Kaistobacter</i>	0,2	0,7	0,0	0,0
<i>Novosphingobium</i>	0,1	0,1	0,0	0,0
<i>Sphingomonas</i>	0,2	0,0	0,0	0,9
<i>Sphingopyxis</i>	0,1	0,1	0,0	0,0
<i>Acidovorax</i>	0,6	0,1	0,0	0,0
<i>Comamonas</i>	0,3	0,1	0,1	0,0
<i>Hydrogenophaga</i>	2,1	1,0	1,0	1,3
<i>Leptothrix</i>	0,1	0,1	0,0	0,0
<i>Limnobacter</i>	0,1	0,1	0,6	0,0
<i>Methylibium</i>	0,1	0,0	0,1	0,0
<i>Variovorax</i>	0,1	0,2	0,1	0,0
<i>Cupriavidus</i>	0,3	0,1	0,0	0,0
<i>Gallionella</i>	6,2	8,9	7,2	1,2
<i>Chromobacterium</i>	0,0	0,0	0,0	0,1
<i>Vogesella</i>	0,8	0,1	0,1	0,0
<i>Azoarcus</i>	0,4	4,8	0,0	0,0
<i>Dechloromonas</i>	0,9	1,5	0,0	0,0
<i>Sulfuritalea</i>	0,1	0,3	0,0	0,0
<i>Bdellovibrio</i>	0,5	0,3	0,4	8,4
<i>Geobacter</i>	0,1	3,6	1,5	0,0
<i>Arcobacter</i>	1,5	0,4	0, 0	0,0
<i>Sulfuricurvum</i>	0,0	0,0	0,1	0,0
<i>Cellvibrio</i>	5,6	1,2	0,6	0,3
<i>HTCC</i>	0,1	0,0	1,6	0,4
<i>Shewanella</i>	0,1	0,2	0,0	0,0
<i>Rheinheimera</i>	4,7	1,7	1,2	0,1
<i>Erwinia</i>	0,1	0,2	0,0	0,0
<i>Crenothrix</i>	0,5	0,4	1,0	1,9

<i>Methylomonas</i>	0,2	0,1	0,0	0,0
<i>Acinetobacter</i>	0,8	0,1	0,0	0,0
<i>Perluclidibaca</i>	0,1	0,0	0,9	1,2
<i>Pseudomonas</i>	5,9	1,6	0,3	0,3
<i>Methylophaga</i>	0,8	0,3	0,0	0,0
<i>Mariprofundus</i>	0,0	0,0	0,5	0,0

### 3.3.3 Selección y Aislamiento de Bacterias Oxidantes de Mn

Luego de determinar la diversidad de la comunidad bacteriana presente en las plantas de tratamiento de aguas de LT y VO y de corroborar que existe una abundante proporción de géneros previamente descritos en la literatura como MOB (Tabla 3.5.), se procedió al aislamiento de estas bacterias. Se utilizaron como inóculo inicial muestras de arena provenientes del PF y F de ambas plantas de tratamiento de aguas. El procedimiento utilizado para el reconocimiento de las bacterias de interés (Materiales y Métodos Sección 3.2.3.) se representa en la Figura 3.4., mediante el cual se obtuvieron 202 aislados putativos oxidantes de Mn(II). En la Tabla 3.6. se resume el número de aislados obtenidos con cada medio de cultivo utilizado para la selección.



**Figura 3.4. Crecimiento de bacterias oxidantes de Mn en medio sólido.**

A) Se muestra un ejemplo representativo de cómo fueron identificadas las MOB. Se puede observar la detección de color oscuro debido a los óxidos depositados alrededor de las células en medios suplementados con de  $\text{MnSO}_4$  100 $\mu\text{M}$  (placa de la derecha) y la desaparición del color oscuro de las bacterias oxidantes de Mn en ausencia de Mn en el medio de cultivo (placa de la izquierda).

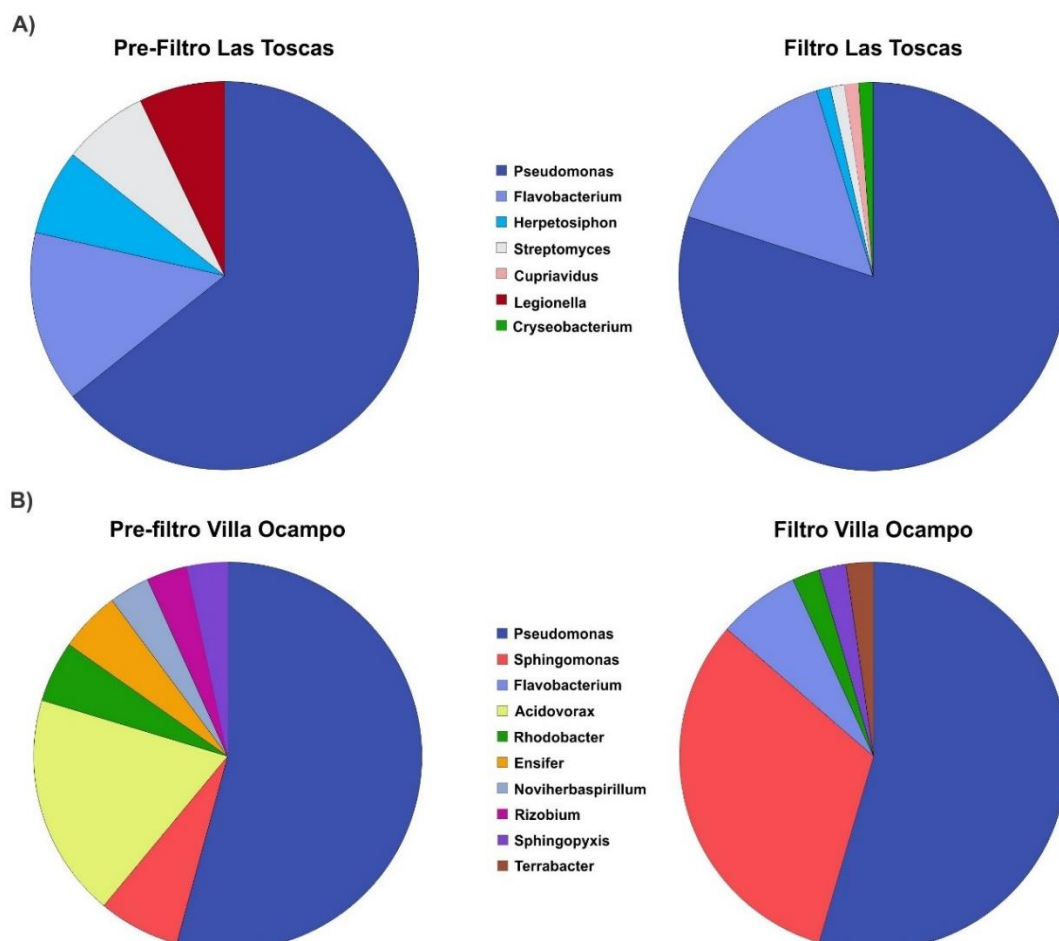
B) Para confirmar que el color marrón corresponde a óxidos de Mn, se realizó una tinción con el colorante LBB; el color azul indica la presencia de óxidos de Mn (las colonias teñidas se señalan con un círculo).

**Tabla 3.6. Número de aislamientos obtenidos a partir de medios selectivos conteniendo Mn(II).**

Medio de Cultivo	Número de Aislamientos	
	LT	VO
Medio PC	54	34
Medio Mn	3	40
Medio Lept	43	28
Total	100	102

### 3.3.3.1 Identificación Molecular de las MOB Seleccionadas

El análisis de las secuencias del gen 16S ARNr de las 202 MOB seleccionadas reveló diferentes perfiles de géneros bacterianos entre las muestras de VO y LT (Figura 3.5.).



**Figura 3.5. Proporción de MOB cultivadas a partir de muestras de plantas de tratamiento biológico de aguas de LT y VO.**

A) Abundancia relativa de las 100 MOB aisladas de muestras del PF y F de la Planta de LT.

B) Abundancia relativa de las 102 MOB aisladas del PF y F de la Planta de VO. Los resultados se muestran a nivel de géneros bacterianos.



Se identificó un total de 15 géneros bacterianos diferentes. La mayoría de las MOB cultivables aisladas pertenecieron al género *Pseudomonas*, un género muy estudiado en la oxidación de Mn(II) (Geszvain *et al.*, 2012). Además, se obtuvo una proporción abundante de *Flavobacterium* spp. en LT; y de *Sphingomonas* spp. y *Acidovorax* spp. en VO. A continuación, en la Tabla 3.7., se detalla el número de bacterias pertenecientes a los distintos géneros identificados en relación con el lugar de origen, PF y F de LT, y PF y F de VO.

**Tabla 3.7. Identidad de los aislamientos en relación al origen de la muestra.**

Identidad Género	Número de aislamientos					
	LT			VO		
	Total	PF	F	Total	PF	F
<i>Pseudomonas</i>	78	9	69	55	32	23
<i>Sphingomonas</i>	-	-	-	18	4	14
<i>Flavobacterium</i>	15	2	13	3	-	3
<i>Acidovorax</i>	-	-	-	11	11	-
<i>Rhodobacter</i>	-	-	-	4	3	1
<i>Ensifer</i>	-	-	-	3	3	-
<i>Noviherbaspirillum</i>	-	-	-	2	2	-
<i>Rhizobium</i>	-	-	-	2	2	-
<i>Sphingopyxis</i>	-	-	-	3	2	1
<i>Herpetosiphon</i>	2	1	1	-	-	-
<i>Streptomyces</i>	2	1	1	-	-	-
<i>Terrabacter</i>	-	-	-	1	-	1
<i>Cupriavidus</i>	1	-	1	-	-	-
<i>Legionella</i>	1	1	-	-	-	-
<i>Chryseobacterium</i>	1	-	1	-	-	-

A fin de caracterizar cada uno de estos aislados a nivel de especie, se realizó el ensayo de identificación de microorganismos por espectrometría de masas MALDI-TOF MS. Esta técnica, sólo permitió la definición a nivel de especie en muy pocos aislados. Sin embargo, permitió reconocer con un alto grado de confianza los aislados patógenos, dado que la base de datos fue diseñada específicamente para tal fin. En el caso del equipo de Bruker utilizado para estos ensayos, los resultados son entregados junto a un score. Si éste es igual o mayor a 2 la identificación es posible a nivel de género y especie; entre 1,7 y 1,9 la identificación es sólo confiable a nivel de género y menor a 1,7 no se permite la identificación. Utilizando esta técnica, varios aislados pertenecientes a especies de *Flavobacterium* spp., *Legionella* spp., *Chryseobacterium* spp., y

*Pseudomonas* spp., se reconocieron como bacterias patógenas y, teniendo en cuenta su potencial aplicación en una estrategia de bioaumentación en sistemas de tratamientos de aguas, estas bacterias se excluyeron para estudios posteriores. Con esta misma consideración, se llevó a cabo un detallado análisis de los demás aislados bacterianos a fin de determinar cuáles valían la pena ser caracterizados. Para ello, se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva, a fin de determinar si alguno de los aislamientos presentaba características indeseables para el proceso. Esto permitió reducir el número de aislamientos a ser estudiados:

- Las bacterias del género *Streptomyces* producen antibióticos y una sustancia conocida como “Geosmina” que causa el típico olor “a tierra” (Asquith *et al.*, 2018). La utilización de este tipo de bacterias en las plantas tratamientos, causaría problemas afectando el olor y el sabor del agua potable, por lo cual se decidió descartar estos aislados del análisis.
- Algunos aislados identificados como *Sphingopyxis* spp., *Herpetosiphon* spp., *Acidovorax* spp., *Rhodobacter* spp., y *Cupriavidus* spp., que comenzaron a oxidar Mn(II) recién después de 30 d de crecimiento, también se descartaron para otros estudios.

Posteriormente, se consideró que aquellos aislamientos que tengan la misma secuencia del gen 16S ARNr van a representar una misma OTU en el análisis de secuenciación masiva del gen 16S ARNr realizado previamente. A los fines de poder realizar un estudio integrativo entre los datos obtenidos por los métodos independientes de cultivo (**Sección 3.3.2**) y los métodos dependientes de cultivo (**Sección 3.3.3**) realizados en este trabajo, se decidió agrupar todos los aislamientos que comparten la misma identidad de secuencia del gen 16S ARNr y elegir un único representante de cada grupo para ser caracterizado. Para la elección del representante se repicaron todos los aislamientos del mismo grupo (idéntica secuencia del gen 16S ARNr) en una misma placa en presencia de Mn(II) y se tuvieron en cuenta las características fenotípicas de los mismos, principalmente dada por la intensidad del color marrón observado en las placas de selección. De esta manera se eligió, de cada grupo, aquella MOB que mostraba mayor intensidad de color, lo que sugería una mejor capacidad de oxidación de Mn(II).

Por lo tanto, del total de 202 aislados, y descartando todos aquellos microorganismos indeseables para la aplicación biotecnológica, y los que tenían idéntica secuencia del gen 16S ARNr, un subtotal de 23 cepas fueron elegidas para una caracterización posterior. Las mismas se detallan en la (Tabla 3.8.). Se implementó una nomenclatura unificada para representar los aislamientos obtenidos en este trabajo, indicando MOB y el número que corresponde a la posición de los aislamientos en nuestra colección de cepas.

Las secuencias del gen completo 16S ARNr de las 23 cepas elegidas para caracterizar en este estudio fueron depositadas en el banco de datos GenBank dentro del cual se les asignaron los siguientes números de acceso: MK011855-MK011877, como se indica para cada cepa en la Tabla 3.8. Los aislamientos mostraron estar filogenéticamente relacionados con los géneros: *Pseudomonas*, *Noviherbaspirillum*, *Terrabacter*, *Flavobacterium*, *Ensifer*, *Rhizobium* y *Sphingomonas* (Tabla 3.8.). Sólo algunos pudieron ser identificados a nivel de especie mediante los métodos de identificación utilizados y en la Tabla 3.8. se indican aquellos aislamientos que pudieron ser identificados por MALDI-TOF MS. Por otro lado, se detalla el medio de cultivo utilizado para su selección, y el origen de la muestra a partir de la cual fue obtenido cada uno de los aislamientos elegidos. Finalmente, en la Tabla 3.8., se detalla el número de MOB que comparten identidad de secuencia del gen 16S ARNr con los aislados elegidos para posterior caracterización en este estudio.

**Tabla 3.8: Afiliaciones taxonómicas de las 23 MOB elegidas para ser estudiadas en este trabajo.** Se indica el lugar de origen de cada aislado (PF, F de VO o LT), el medio de cultivo en cual fue seleccionado, el número de acceso con el cual fueron depositadas las secuencias del gen 16S ARNr en el banco de datos GenBank y el número de acceso de las secuencias bacterianas más estrechamente relacionadas con cada una de las MOB elegidas para ser estudiadas.

Nombre	Planta	Medio de Selección	Secuencia del gen 16S ARNr más relacionada	Número de Acceso (GenBank)	Número de aislamientos con igual secuencia del gen 16S ARNr
MOB-104	PF VO	PC	<i>Pseudomonas resinovorans</i> (KP322753.1 - 97 %) <i>Pseudomonas resinovorans</i> <sup>a</sup>	MK011855	1
MOB-109	PF VO	PC	<i>Noviherbaspirillum malthae</i> (NR_115809.1 - 97 %)	MK011856	1
MOB-111	PF VO	PC	<i>Noviherbaspirillum malthae</i> (NR_115809.1 - 96 %)	MK011857	1
MOB-206	F LT	PC	<i>Pseudomonas resinovorans</i> (AP013068.1 - 99 %) <i>Pseudomonas alcaligenes</i> (MG905251.1 - 99 %) <i>Pseudomonas</i> sp. (KM187334.1 - 99 %).	MK011858	4
MOB-228	F LT	PC	<i>Pseudomonas jinjuensis</i> (KF815696.1 - 98 %) <i>Pseudomonas citronellolis</i> (JF911368.1 - 98 %) <i>Pseudomonas</i> sp. (DQ118950.1 - 98 %)	MK011859	1
MOB-243	F LT	PC	<i>Pseudomonas</i> sp. (EU043328.1 - 99 %) <i>Pseudomonas</i> sp. (EU043318.1 - 99 %) <i>Pseudomonas</i> sp. (EU043320.1 - 99 %) <i>Pseudomonas flavescens</i> <sup>a</sup>	MK011860	1
MOB-244	F LT	PC	<i>Pseudomonas resinovorans</i> (MG011582.1 - 97 %) <i>Pseudomonas resinovorans</i> <sup>a</sup>	MK011861	2
MOB-342	PF VO	PC	<i>Pseudomonas</i> sp. (MH337930.1 - 98 %) <i>Pseudomonas</i> sp. (HF545851.1 - 98 %) <i>Pseudomonas chlororaphis</i> <sup>a</sup>	MK011862	1
MOB-343	PF VO	PC	<i>Pseudomonas resinovorans</i> (MF943158.1 - 99 %) <i>Pseudomonas alcaligenes</i> (KM272279.1 - 98 %)	MK011863	3

MOB-364	F LT	PC	<i>Pseudomonas</i> sp. (AB047273.1 - 97 %) <i>Pseudomonas resinovorans</i> (AP013068.1 - 97 %)	MK011864	1
MOB-436	PF VO	PC	<i>Pseudomonas resinovorans</i> (KJ870047.1 - 99 %) <i>Pseudomonas alcaligenes</i> (MF682034.1 - 99 %) <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> (KJ586277.1 - 99 %) <i>Pseudomonas linyingensis</i> (NR_117838.1 - 98 %)	MK011865	1
MOB-180	F LT	Lept	<i>Pseudomonas</i> sp. (AF326380.1 - 98 %) <i>Pseudomonas</i> sp. (FJ379321.1 - 98 %)	MK011866	1
MOB-181	F LT	Lept	<i>Pseudomonas guangdongensis</i> (NR_118458.1 - 97 %) <i>Pseudomonas linyingensis</i> (NR_117838.1 - 97 %) <i>Pseudomonas sagittaria</i> (NR_118347.1 - 96 %)	MK011867	32
MOB-182	F LT	Lept	<i>Pseudomonas</i> sp. (AF326380.1 - 99 %) <i>Pseudomonas</i> sp. (FJ379321.1 - 99 %) <i>Pseudomonas</i> sp. (JX416377.1 - 99 %)	MK011868	1
MOB-257	F LT	Lept	<i>Flavobacterium</i> sp. (KF499502.1 - 98 %) <i>Flavobacterium</i> sp. (DQ205296.1 - 98 %)	MK011869	1
MOB-326	F VO	Lept	<i>Terrabacter tumescens</i> (NR_044984.2 - 98 %)	MK011870	1
MOB-412	F LT	Lept	<i>Pseudomonas resinovorans</i> <sup>a</sup>	MK011871	1
MOB-449	F VO	Lept	<i>Pseudomonas resinovorans</i> (KY368643.1 - 96 %) <i>Pseudomonas alcaligenes</i> (KM272279.1 - 96 %) <i>Pseudomonas resinovorans</i> <sup>a</sup>	MK011872	13
MOB-505	F LT	Lept	<i>Pseudomonas resinovorans</i> (MG011582.1 - 98 %) <i>Pseudomonas resinovorans</i> <sup>a</sup>	MK011873	5
MOB-513	F LT	Lept	<i>Pseudomonas</i> sp. (KC782842.1 - 96 %) <i>Pseudomonas</i> sp. (FJ959376.1 - 96 %) <i>Pseudomonas</i> sp. (MG266358.1 - 96 %)	MK011874	1
MOB-68	PF VO	Mn	<i>Ensifer</i> sp. (MF621571.1 - 99 %) <i>Ensifer adhaerens</i> (EU095366.1 - 99 %)	MK011875	1

MOB-58	PF VO	Mn	<i>Rhizobium sp. (KX611611.1 - 99 %)</i> <i>Rhizobium sp. (KY575353.1 - 99 %)</i>	MK011876	2
MOB-382	F VO	Mn	<i>Sphingomonas leidy</i> <sup>a</sup>	MK011877	16
Total					92

Las especies bacterianas se identificaron mediante las secuencias del gen 16S ARNr y el análisis MALDI-TOF MS.

<sup>a</sup> Indica que estas bacterias fueron identificados a nivel de especie por el análisis de MALDI-TOF (con score  $\geq 2,0$ ).

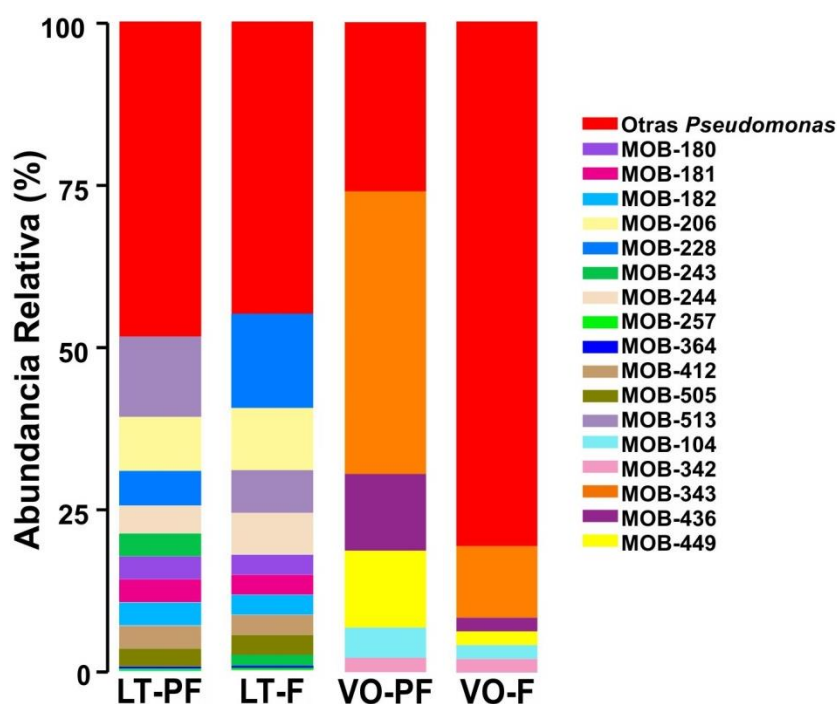
Con el fin de vincular los resultados obtenidos a partir de la secuenciación masiva del gen 16S ARNr, de las comunidades bacterianas presentes en las plantas de LT y VO, con los resultados del aislamiento de MOB cultivables en este trabajo, se determinó la proporción en la que las 23 MOB caracterizadas (Tabla 3.8.) estaban presentes en las plantas de tratamiento de origen. Para ello, las secuencias de Sanger del gen 16S ARNr de las 23 MOB se compararon con todas las secuencias de genes 16S ARNr obtenidas de muestras de LT y VO mediante la secuenciación de Illumina.

No se pudo determinar la abundancia de las MOB cultivadas *Noviherbaspirillum* spp., *Terrabacter* spp., *Ensifer* spp., y *Rhizobium* spp., dado que los mismos no se identificaron mediante la secuenciación de Illumina a nivel de género. Por otro lado, se pudo determinar que las *Sphingomonas* spp. cultivadas en este trabajo representaban el 0,2 % de la comunidad bacteriana total del PF de LT y el 0,9 % del F de VO.

Dado que los aislamientos pertenecientes al género *Pseudomonas* fueron los más abundantes identificados por métodos dependientes de cultivo, se decidió analizar su abundancia en detalle.

La abundancia de OTUs pertenecientes al género *Pseudomonas* en LT fue del 5,9 % en el PF y del 1,6 % en el F (Tabla 3.5.). Se determinó que el 51,1 % de las *Pseudomonas* del PF de LT y el 56,2 % de las *Pseudomonas* del F de LT se correspondían con las OTUs de las *Pseudomonas* que se pudieron cultivar en este trabajo (Figura 3.6.).

En VO, las *Pseudomonas* representaron el 0,3 % de la comunidad bacteriana tanto en el PF como en el F, de acuerdo con los datos de secuenciación de Illumina (Tabla 3.5.). De estas lecturas, el número de las MOB cultivables caracterizadas en este trabajo representó casi el 74 % del total en el PF y el 20 % en el F (Figura 3.6.).



**Figura 3.6. Proporción de *Pseudomonas* cultivadas en PF y F de LT y VO.**

Los gráficos de barras muestran la proporción en la que las *Pseudomonas* oxidantes de Mn(II) cultivadas en este trabajo se encuentran en las plantas de tratamiento de donde fueron obtenidas. Para calcular la abundancia se tuvo en cuenta el número total de OTUs de *Pseudomonas* encontradas por la secuenciación de Illumina. Las barras rojas indican el porcentaje de otras *Pseudomonas* no caracterizadas en este trabajo.

### 3.3.4 Caracterización de las MOB Cultivables Elegidas

#### 3.3.4.1 Estudio de la Capacidad de Oxidación de Mn(II)

A fin de determinar cuáles eran las mejores oxidantes de Mn(II), aquellas 23 cepas elegidas para ser estudiadas fueron agrupadas según el medio de cultivo en el cual fueron seleccionadas inicialmente: Mn, PC o Lept (Tabla 3.8.) y luego se realizaron comparaciones de las capacidades de oxidación de Mn(II) entre cepas de cada grupo. Las capacidades de oxidación fueron evaluadas en medios de cultivo sólidos, donde las células crecen sobre una superficie, semejante a lo que sucede en un biofilm. Esto estuvo relacionado con el interés de aplicar estas bacterias en procesos de remoción de Mn(II), donde tendrán que oxidar el Mn(II) presente en agua “pegadas” sobre superficies sólidas, tales como la arena del biofiltro.

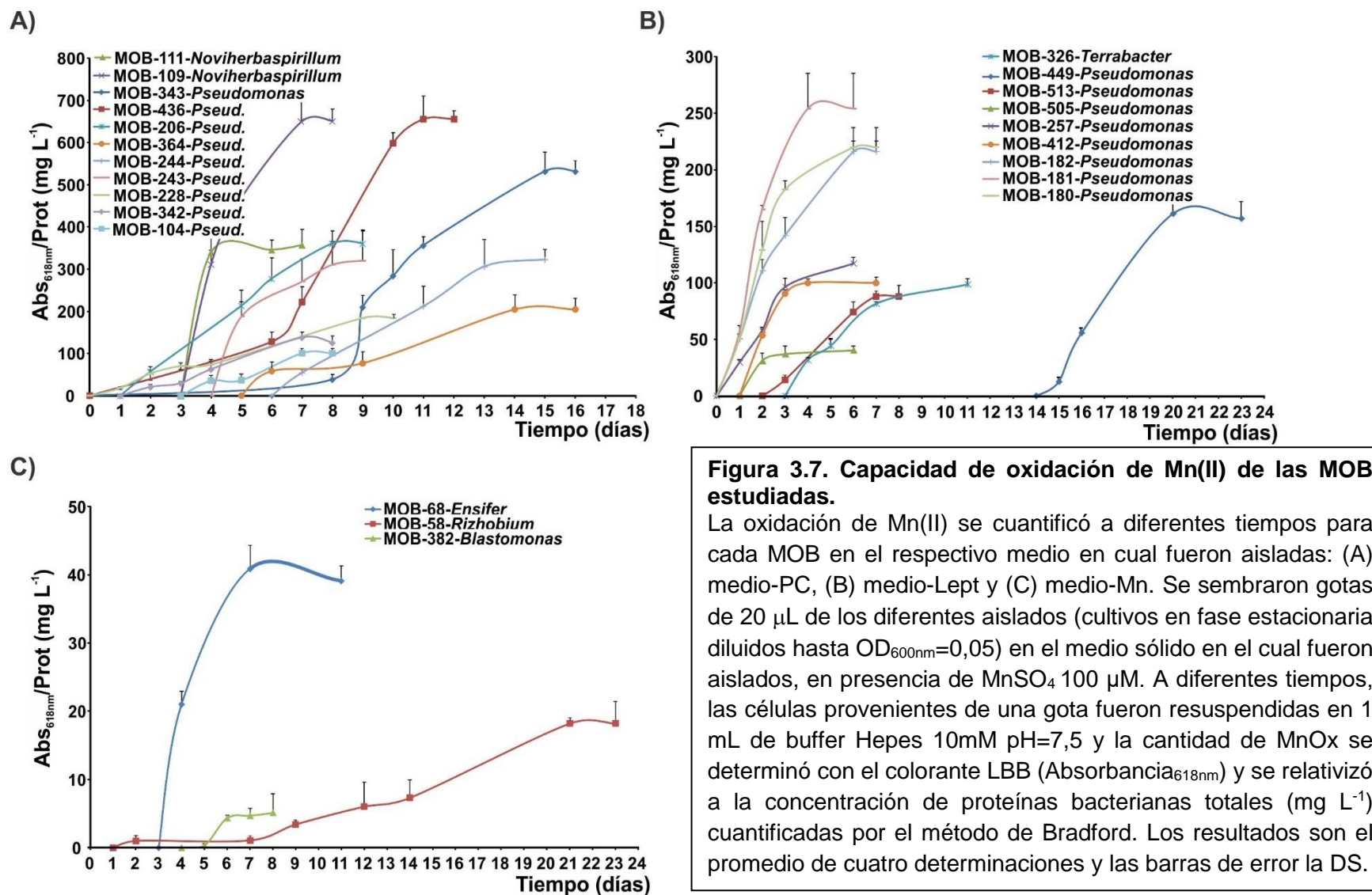
Los resultados mostraron que la capacidad y el comienzo de la oxidación de Mn(II) en el medio de cultivo variaba dependiendo de cada MOB (Figuras 3.7.



A, B, C). Entre las MOB seleccionadas en medio-PC, la *Noviherbaspirillum* MOB-109 y las *Pseudomonas* MOB-436 y MOB-343, tuvieron el mejor desempeño en cuanto a la oxidación de Mn(II), alcanzando el máximo a los 7, 11 y 15 d, respectivamente (Figura 3.7.A).

En el grupo de las cepas seleccionadas en medio-Lept, las *Pseudomonas* MOB-180, MOB-181, MOB-182 mostraron la mejor capacidad de oxidación en tiempos de crecimiento más cortos (4 d) (Figura 3.7.B). Debido a la gran similitud entre ellas, sólo una de estas cepas, MOB-181, se caracterizó completamente en este estudio. Por otro lado, la *Pseudomonas* MOB-449 reveló la siguiente capacidad de oxidación más alta luego de 20 d de crecimiento (Figura 3.7.B). Entre otros géneros bacterianos, el aislado MOB-326 (*Terrabacter*) resultó ser un buen oxidante de Mn(II) y nunca antes se había reportado la asociación de este género bacteriano con estos procesos (Figura 3.7.B). Finalmente, los aislados ensayados en Medio-Mn no mostraron buenas capacidades de oxidación de Mn(II) (Figura 3.7.C).

Por lo tanto, sobre las bases de su alta capacidad de oxidación de Mn(II), MOB-343, MOB-436 y MOB-109 (obtenidos en medio-PC), MOB-181, MOB-449 y MOB-326 (obtenidos en medio-Lept), pertenecientes a tres géneros bacterianos distintos, fueron elegidos para ser caracterizados en estudios posteriores.

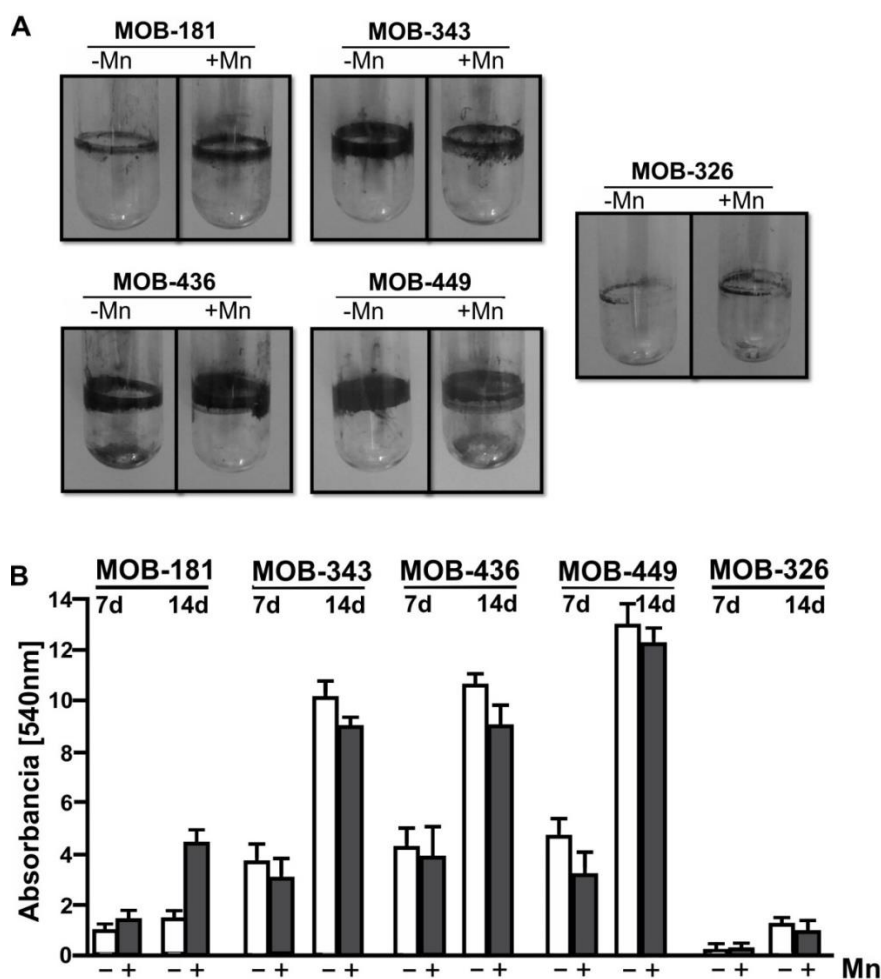


### 3.3.4.2 Estudio de la Capacidad de Formación de Biofilm

Las seis cepas elegidas en función de su capacidad de oxidación de Mn(II) fueron analizadas para determinar la capacidad de formación de biofilms, en presencia y ausencia de Mn(II), a 28 °C. La tinción de células bacterianas con el colorante CV en ambas condiciones mostró que las cepas del género *Pseudomonas* tenían la capacidad de formar muy buenos biofilms, desarrollando anillos en la superficie aire-líquido del medio de cultivo, destacándose MOB-449 como la mejor, mientras que los biofilms formados por la *Terrabacter* MOB-326 fueron significativamente menores (Figura 3.8. A). La cepa MOB-109 del género *Noviherbaspirillum* no pudo formar biofilms en las condiciones ensayadas. Estos resultados se corroboraron a los 7 y 14 d mediante cuantificación por medidas de absorbancia del colorante CV (Figura 3.8.B).

La capacidad de formación de biofilms de MOB-181 se incrementó mediante la adición de Mn(II) al medio de crecimiento estático ( $p < 0,05$ ) (Figura 3.8.B). Para las demás MOB no hubo diferencias entre los biofilms formados en presencia y ausencia de este metal (Figura 3.8.B).

Estos ensayos revelaron que MOB-181, MOB-326, MOB-343, MOB-436 y MOB-449 tienen la capacidad adherirse a superficies sólidas, lo que confirma su potencial para aplicaciones biotecnológicas en biofiltros de agua. MOB-109 se excluyó de los análisis posteriores porque no tuvo la capacidad de formar biofilms en las condiciones ensayadas.



**Figura 3.8. Ensayos de formación de biofilm de las MOB seleccionadas.**

(A) Fotografías representativas de los biofilms formados por las MOB crecidas estáticamente con o sin MnCl<sub>2</sub> 100  $\mu$ M (-Mn o +Mn, respectivamente) a 28 °C en tubos de vidrio durante 14 d.

(B) Cuantificación espectrofotométrica de la formación de biofilms por tinción con CV (Absorbancia 540 nm). Los valores representan el promedio de tres réplicas, y las barras de error indican el desvío estándar (DS).

A continuación, se examinaron algunos parámetros ambientales que se consideraron que pueden ser importantes para determinar la tasa de oxidación de Mn(II), teniendo en cuenta la potencial aplicación de estas MOB. Se analizó el efecto de la temperatura, que varía inevitablemente a lo largo del día y de las diferentes estaciones del año, y se decidió dejar de lado las fluctuaciones de pH dado que este parámetro resulta relativamente constante en las aguas a tratar. Además, se consideró importante las fluctuaciones de concentraciones de Mn(II) en las aguas de nuestra región, así como también la presencia de iones inhibidores tales como el ion Fe(II).

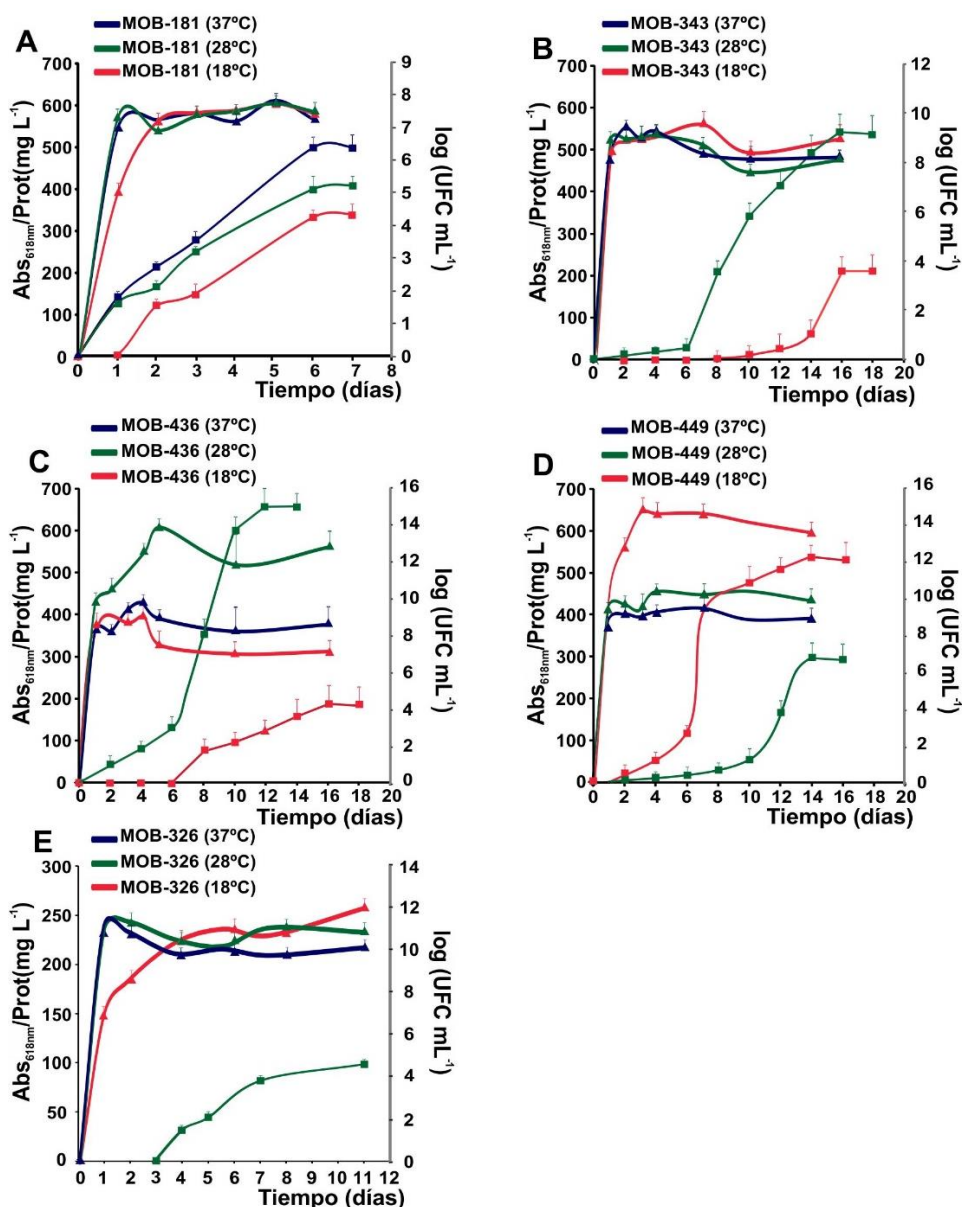
### 3.3.4.3 Influencia de la Temperatura en la Capacidad de Oxidación de Mn(II) de las MOB Seleccionadas

Se investigó el rendimiento de la oxidación de Mn(II) a diferentes temperaturas de crecimiento para las cinco MOB que exhibieron las mejores capacidades de oxidación de Mn(II) y de formación de biofilm. Dado que las MOB de interés fueron obtenidas en medios de cultivo selectivos diferentes (PC y Lept), se evaluó cualitativamente si eran capaces de oxidar en un mismo medio de cultivo. Las *Pseudomonas* MOB-181 y MOB449, aisladas en medio-Lept, pudieron oxidar Mn(II) en todos los medios utilizados en este estudio, pero MOB-343 y MOB-436 oxidaron Mn(II) solamente en medio-PC. De este modo, se decidió usar este último medio para hacer un análisis comparativo del rendimiento entre las distintas cepas del género *Pseudomonas*. Por otro lado, dado que MOB-326 sólo fue capaz de oxidar Mn(II) en el medio-Lept, utilizado en el procedimiento de selección, se realizaron ensayos adicionales con esta cepa en este medio.

Las cepas se cultivaron a 18, 28 y 37 °C y se cuantificó, a diferentes tiempos, tanto el crecimiento bacteriano como la capacidad de oxidación de Mn(II). En todos los casos, la actividad de oxidación de Mn(II) resultó ser dependiente de la temperatura, variando el óptimo según la cepa (Figura 3.9.).

Las curvas de crecimiento de MOB-181 fueron similares en las tres temperaturas ensayadas ( $p < 0,05$ ) (Figura 3.9. A). Esta MOB comenzó la oxidación de Mn(II) al inicio de la fase estacionaria; fue capaz de oxidar el metal en todas las temperaturas analizadas y presentó la capacidad máxima de oxidación de Mn(II) a 37 °C luego de 6 d de crecimiento ( $p < 0,05$ ) (Figura 3.9.A). MOB-343 creció de forma similar en todas las temperaturas ensayadas, no mostró actividad oxidante de Mn(II) a 37 °C y, tanto a 18 como a 28 °C, la oxidación de Mn(II) comenzó durante la fase estacionaria tardía y la óptima de oxidación de Mn(II) se observó a 28 °C ( $p < 0,05$ ) (Figura 3.9.B). MOB-436 alcanzó la fase estacionaria al mismo tiempo en todas las temperaturas ensayadas, pero el crecimiento fue mejor a 28 °C ( $p < 0,05$ ) (Figura 3.9.C). Esta MOB comenzó la oxidación de Mn(II) durante la fase estacionaria y la capacidad máxima de oxidación de Mn(II) coincidió con su temperatura óptima de crecimiento, 28 °C ( $p < 0,05$ ) (Figura 3.9.C). MOB-449 alcanzó la fase estacionaria al mismo tiempo en todas las temperaturas, pero el crecimiento

óptimo se observó a 18 °C ( $p < 0,05$ ) (Figura 3.9.D). La oxidación de Mn(II) de MOB-449 ocurrió durante la fase estacionaria tardía, alcanzando su máxima capacidad y comenzando antes a 18 °C que a 28 °C, y no se detectó oxidación a 37 °C ( $p < 0,05$ ) (Figura 3.9. D). Las curvas de crecimiento para MOB-326 fueron similares a las tres temperaturas analizadas pero esta bacteria solo oxidó Mn(II) a 28 °C (Figura 3.9.E).

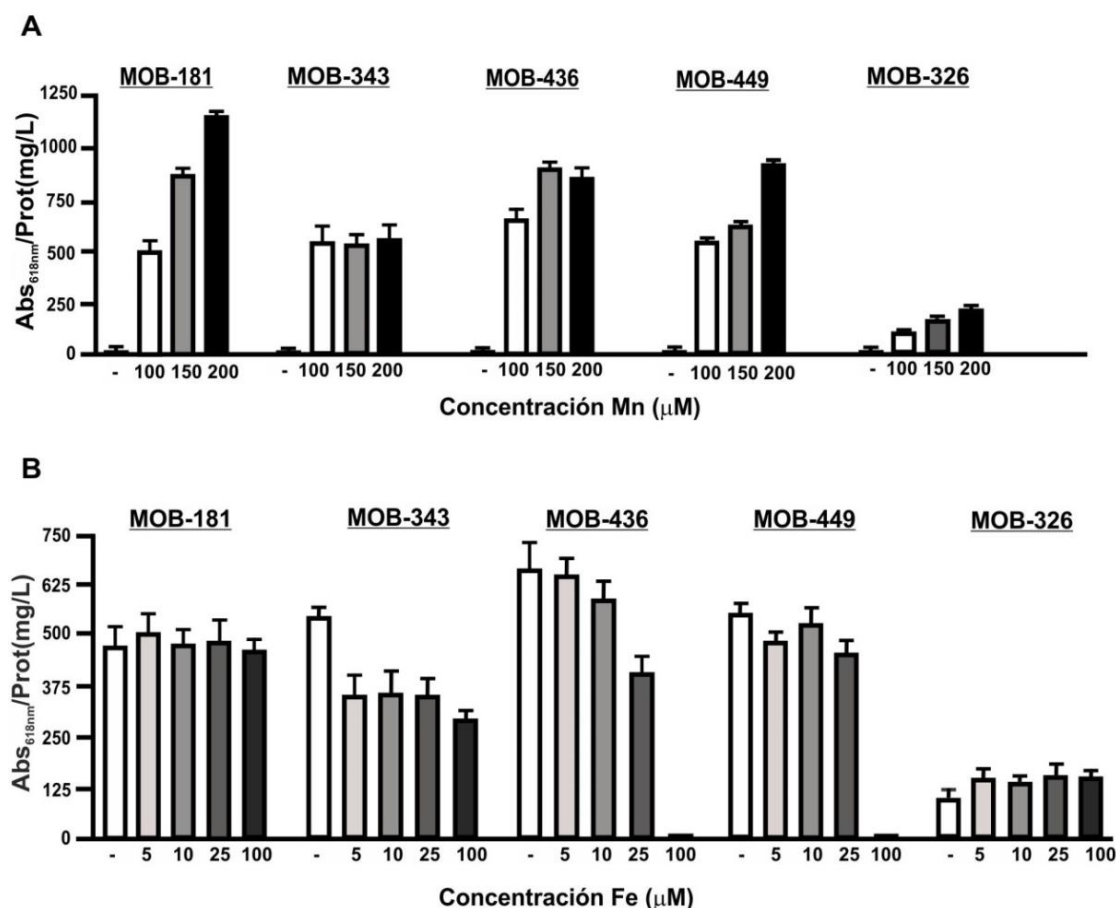


**Fig. 3.9. Efecto de la temperatura sobre las capacidades de oxidación de Mn(II) de las MOB seleccionadas.** Cuantificación de la oxidación de Mn(II) (cuadros) de las cepas MOB-181 (A), MOB-343 (B), MOB-436 (C) y MOB-449 (D) en medio PC; y de MOB-326 (E) en medio Lept, a diferentes temperaturas (18, 28 y 37 °C). Los ejes del lado derecho de la gráfica representan el crecimiento bacteriano a las diferentes temperaturas (como log UFC mL<sup>-1</sup>) en función del tiempo (triángulos). Los valores representan la media de las mediciones realizadas por triplicado. Las barras de error indican la DS. Significancia:  $p < 0,05$ .

#### **3.3.4.4 Variabilidad de la Oxidación de Mn(II) en Presencia de Diferentes Metales en el Medio de Cultivo**

Las capacidades de oxidación de Mn(II) de las MOB de interés se evaluaron en presencia de diferentes concentraciones de MnSO<sub>4</sub> en el medio de cultivo (100  $\mu$ M, 150  $\mu$ M y 200  $\mu$ M). Todas las cepas analizadas fueron capaces de oxidar Mn(II) a concentraciones más altas de este metal (hasta 200  $\mu$ M). Para MOB-181, MOB-326 y MOB-449, cuanto mayores concentraciones de Mn(II) estuvieron presentes en el medio, mejores capacidades de oxidación de este metal se obtuvieron ( $p < 0,05$ ) (Figura 3.10.A). Aunque la oxidación de Mn no se inhibió en presencia de mayores concentraciones de este metal, MOB-343 y MOB-436 alcanzaron el máximo para esta actividad a 100 y 150  $\mu$ M de concentración de MnSO<sub>4</sub>, respectivamente (Figura 3.10.A).

En cuanto al suplemento con Fe(II), la oxidación de Mn(II) no se vio afectada por este metal en las cepas MOB-181 y MOB-326 (Figura 3.10.B). La oxidación de Mn(II) fue inhibida por una concentración de Fe(II) igual a 100  $\mu$ M en MOB-436 y MOB-449, y esta actividad se redujo en todas las concentraciones de Fe(II) ensayadas para la cepa MOB-343 (Fig. 3.10.B).



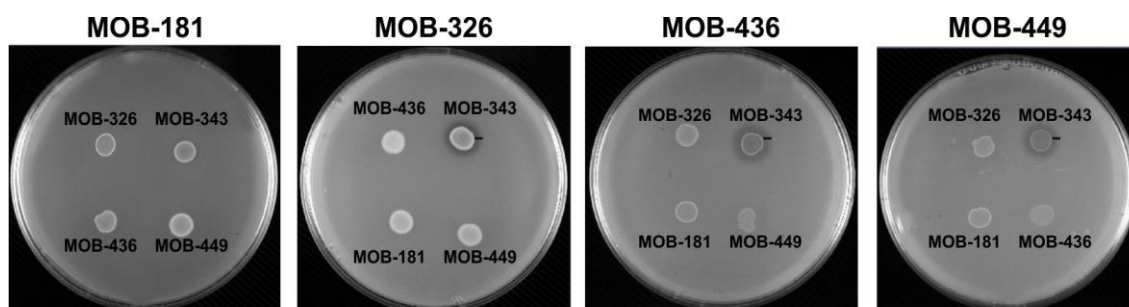
**Fig. 3.10. Influencia de diferentes concentraciones de metales en las capacidades de oxidación de Mn(II) de la MOB seleccionadas.**

Se cuantificó la oxidación de Mn(II) de las cepas MOB-181, MOB-343, MOB-436 y MOB-449 en medio PC y de MOB-326 en medio Lept, incubadas con A) concentraciones crecientes de MnSO<sub>4</sub> (100, 150 y 200 µM) y B) con concentraciones crecientes de FeSO<sub>4</sub> (5, 10, 25 y 100 µM) en presencia de MnSO<sub>4</sub> 100 µM. Se incubaron las bacterias en su temperatura óptima de oxidación de Mn(II) (Figura 3.9). Las cuantificaciones se realizaron a distintos tiempos, pero solamente se muestra el tiempo en el que se alcanzó la mayor capacidad de oxidación de Mn(II). Los valores representan la media de las mediciones hechas por triplicado. Las barras de error indican la DS. Significado: p < 0,05.

### 3.3.4.5 Ensayos de Interacción en el Crecimiento de MOB

De acuerdo con el objetivo final de utilizar estas cepas para realizar inóculos mixtos en plantas de tratamiento de aguas subterráneas, se llevaron a cabo interacciones de crecimiento *in vitro* de las cinco cepas seleccionadas. En presencia de la cepa MOB-343, se observaron efectos inhibitorios sobre el crecimiento y la supervivencia de las cepas MOB-326, MOB-436 y MOB-449, evidenciadas por los halos de inhibición desarrollados (Figura 3.11.).





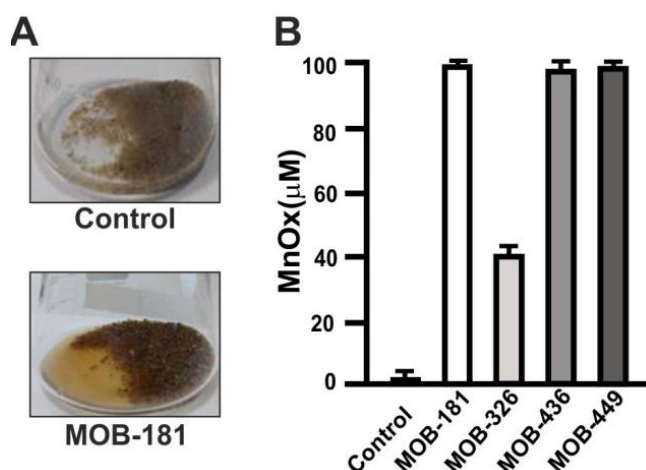
**Figura 3.11. Ensayos de interacción en el crecimiento.**

Se detectó la inhibición en el crecimiento de una cepa por otra evidenciado por la aparición de halos de inhibición. En los paneles superiores se indican los nombres de las cepas que fueron plaqueadas sobre el LB agar. Las líneas negras indican la zona de crecimiento inhibitoria alrededor de las gotas de MOB-343 sobre los pastos de otras bacterias.

### 3.3.4.6 Oxidación Mn(II) Presente en Aguas Subterráneas por MOB

#### Inmovilizadas

El proceso de remoción de Mn(II) en un sistema de filtros requiere la acción de microorganismos que puedan oxidar este metal unidos a una superficie sólida. Por lo tanto, se analizó el rendimiento de las MOB inmovilizadas sobre arena en la oxidación de Mn(II) presente en aguas subterráneas. Se observó una coloración marrón en los sobrenadantes debido a la presencia de MnOx generados en los Erlenmeyer que contenían arenas con las diferentes MOB inmovilizadas sobre la superficie. Como ejemplo, se muestra la oxidación de Mn(II) por la cepa MOB-181, 7 d después de la inmovilización (Figura 3.12.A). La cuantificación de los MnOx mediante el ensayo LBB reveló que MOB-181, MOB-436 y MOB-449 fueron capaces de oxidar todo el Mn(II) presente en el agua subterránea al cabo de 7 d, mientras que en este tiempo MOB-326 oxidó sólo el 40 % del Mn(II) presente (Figura 3.12. B). No hubo evidencia de oxidación de Mn en el control libre de células (Figura 3.12. A y B).



**Figura 3.12. Oxidación de Mn(II) de aguas subterráneas por bacterias inoculadas en arena.**

(A) Fotografía representativa de la oxidación de Mn(II) de aguas conteniendo una concentración de Mn(II) 100 μM. En el panel inferior se muestra la oxidación de MOB-181 inmovilizada sobre la arena y se puede apreciar la ausencia de oxidación de Mn(II) en arenas no inoculadas con bacterias, utilizadas como control (panel superior).

(B) Se cuantificó la concentración de MnOx formados por las MOB inmovilizadas en arena después de 7 d de incubación en el agua cruda. Se realizaron tres experimentos independientes y se muestran los valores medios (barras) y DS (barras de error). Significancia:  $p < 0,05$

### 3.4 Discusión

Actualmente, la filtración biológica se utiliza para eliminar los metales presentes en el agua subterránea dado que es una tecnología muy rentable y que minimiza el uso de oxidantes químicos (Burger *et al.*, 2008; Mouchet, 1992; Vandenabeele *et al.*, 1992). Sin embargo, en estos procesos biológicos, sólo se puede lograr una eliminación óptima de Mn(II) en sistemas que tengan comunidades microbianas apropiadas, es decir, con un gran número de MOB eficientes en los procesos de oxidación de Mn(II) y de formación de biofilm. En este trabajo, a fin de caracterizar nuevas bacterias autóctonas que cumplan con estas características, se estudió el microbioma total de dos plantas de tratamiento biológico de aguas subterráneas (LT y VO) con un alto rendimiento para la eliminación de Mn(II).

En concordancia con otros estudios de biodiversidad biológica bacteriana de plantas de tratamiento de aguas subterráneas, Proteobacteria fue el filo dominante en todos los PF y F, lo que sugiere su papel central en los procesos de remoción de Mn(II) (Albers *et al.*, 2015a; Burger *et al.*, 2008; Cerrato *et al.*,

2010; Gulay *et al.*, 2016; Katsoyiannis y Zouboulis, 2004; Mouchet, 1992; Nitzsche *et al.*, 2015; Vandenabeele *et al.*, 1992).

Nitrospirae fue el segundo filo más abundante encontrado tanto en LT como en VO, y esto es consistente con otros reportes donde también se advirtió su presencia en plantas de tratamiento biológico de aguas subterráneas (Gulay *et al.*, 2016). El género *Nitrospira*, involucrado en la nitrificación a través de la oxidación de nitritos, fue el predominante en este filo (Tabla 3.5.). La nitrificación es de gran importancia para la eliminación de nitrógeno en las plantas de tratamiento de aguas. El amonio se oxida primero a nitrito a través de bacterias oxidantes de amoníaco de la familia Nitrosomonadaceae, y luego a nitrato por bacterias oxidantes de nitrito como *Nitrospira*. De acuerdo con los valores físico-químicos de las aguas crudas (Tabla 3.3.), se puede especular que este grupo de bacterias está participando de la remoción del amonio presente. Se puede apreciar también que la abundancia del filo Nitrospirae es mucho más significativo en la planta de VO, donde la concentración de amonio en el agua cruda es ampliamente mayor.

Curiosamente, el filo *Verrucomicrobia* resultó ser muy abundante en el F de VO, lo que podría sugerir un papel de estas bacterias en la eliminación de Mn(II). Sin embargo, estas bacterias nunca se han relacionado con plantas de tratamiento biológico de aguas subterráneas.

Dentro del grupo Proteobacteria, los géneros bacterianos *Gallionella* y *Rheinheimera* han sido previamente reportados como bacterias oxidantes del Fe(II) (Chen *et al.*, 2013; Fleming *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014). Ambos géneros estuvieron presentes tanto en las plantas de LT como de VO y una gran cantidad de estas bacterias se encontraron principalmente en los PF (Tabla 3.5.). Por lo general, ambos iones metálicos, Fe y Mn, coexisten en las aguas subterráneas y LT y VO son ejemplos de esto (Tabla 3.3). Estos resultados sugieren que además de la oxidación abiótica del Fe mediante aereación (Katsoyiannis y Zouboulis, 2004), las bacterias oxidantes del Fe están colaborando con la remoción de este metal en ambos sistemas de filtración.

Varios géneros asociados con MOB estuvieron presentes tanto en LT como en VO, y son géneros que comúnmente están asociados con la eliminación de Mn(II) en los biofiltros para el tratamiento de aguas. Este análisis permitió planificar los procedimientos de selección y aislamientos de MOB a partir de

muestras provenientes de ambas plantas. Se obtuvo un gran número de MOB heterótrofas cultivables en este estudio y su posterior identificación demostró que la mayoría de los aislamientos obtenidos pertenecían al género *Pseudomonas*, un género bien caracterizado como MOB (Geszvain *et al.*, 2011), con amplia diversidad metabólica, adaptabilidad, y fácilmente cultivable en el laboratorio. Algunas MOB obtenidas en este trabajo tales como *Ensifer* spp., *Terrabacter* spp., *Noviherbaspirillum* spp., *Sphingopyxis* spp., *Herpetosiphon* spp., *Legionella* spp. y *Chryseobacterium* spp., no habían sido reportadas previamente en la literatura como oxidantes de Mn(II). En el laboratorio se continuará estudiando estos nuevos géneros de MOB con el objetivo de ampliar el conocimiento de nuevos mecanismos moleculares de oxidación biológica del Mn(II). Por otro lado, la gran dificultad que se presentó para poder caracterizar los aislados cultivados a nivel de especie, mediante alineamiento de secuencias del gen 16S ARNr y por espectrometría de masas MALDI-TOF MS, sugiere que la gran mayoría de las MOB cultivables recuperadas podrían corresponder a nuevas especies bacterianas no identificadas previamente.

Teniendo en cuenta que las muestras ambientales generalmente presentan pequeñas cantidades de bacterias cultivables, siendo en su gran mayoría microorganismos difíciles de obtener en el laboratorio mediante técnicas convencionales, en este trabajo, se logró aislar una gran cantidad de MOB. En general, los géneros bacterianos pertenecientes a las MOB cultivadas (Tabla 3.6.) representaron sólo una baja proporción del total de las bacterias presentes en ambas plantas de tratamiento de aguas (Tabla 3.5.). Un ejemplo notable es el caso de las *Pseudomonas*, que si bien fue el género más abundante obtenido mediante cultivo en el laboratorio, se observó que representan solo el 7,5 % y el 0,6 % en las plantas de LT y VO, respectivamente. Estos resultados sugieren dos posibilidades, que los impulsores de la oxidación de Mn(II) en los biofiltros podrían ser miembros menores de la comunidad bacteriana total, o bien, que hay bacterias no cultivables que son los miembros principales que desempeñan un papel en el proceso de oxidación de Mn(II).

Un total de 23 MOB fueron elegidas para ser caracterizadas en este trabajo debido a que presentan características deseables, considerando su potencial aplicación biotecnológica en la remoción de Mn(II) de aguas. Las secuencias de Sanger del gen 16S ARNr de estas MOB permitieron determinar su abundancia

en las muestras de las LT y VO a partir de las cuales fueron obtenidas. Las MOB cultivadas *Noviherbaspirillum* spp., *Terrabacter* spp., *Ensifer* spp., y *Rhizobium* spp., no se identificaron mediante la secuenciación de Illumina a nivel de género, lo que sugiere que incluso si estas bacterias están presentes en cantidades bajas, pueden cultivarse fácilmente en condiciones de laboratorio. Las *Sphingomonas* spp. cultivadas en este trabajo representaron el 0,2 % de la comunidad bacteriana total en el PF de LT y el 0,9 % en el F de VO, mostrando una poca abundancia en las muestras de origen y, a su vez, una cierta facilidad para su recuperación en el laboratorio.

Una gran proporción de las *Pseudomonas* presentes en las plantas de LT y VO se pudieron cultivar en este trabajo (Figura 3.6.). Se observó que MOB-343 mostró la mayor abundancia en la planta de tratamiento de VO (Figura 3.6.) pero tuvo mucha resistencia a los métodos dependientes de cultivo, dado que se obtuvo un bajo número de aislamientos cultivables (Tabla 3.8.). Estos resultados sugieren que MOB-343 es difícil de cultivar en el laboratorio. Otra particularidad es que esta bacteria mostró tener efectos inhibitorios del crecimiento de tres MOB caracterizadas en este trabajo (Figura 3.11), posiblemente esta propiedad le permita tener ventajas a la hora de ganar territorio en la matriz del sistema de filtrado y por esto se encontró una gran abundancia de la misma por el método de secuenciación de Illumina.

Por otro lado, las bacterias que fueron cultivadas con mayor facilidad que MOB-343, como el caso de MOB-181 y MOB-449 provenientes de LT y VO, respectivamente, no fueron las *Pseudomonas* más abundantes presentes en las muestras de origen, sugiriendo que son MOB fácilmente cultivables en el laboratorio.

Diversos reportes muestran que una serie de factores influyen en la capacidad de oxidación de Mn(II) mediada microbiológicamente, incluyendo la temperatura, la presencia de inhibidores, los niveles de O<sub>2</sub>, etc. (Tebo y Emerson, 1985). Las fluctuaciones de estos factores conducen a cambios en la oxidación de Mn(II) y en la formación de óxidos (Thamdrup y Canfield, 1996). También se encuentra que las concentraciones en exceso de Mn(II) acuoso y la presencia de otros elementos, tales como el Fe, inhiben la oxidación (Tebo y Emerson, 1985). En este trabajo se caracterizó cómo afectan diversos factores

la capacidad de oxidación de Mn(II) de cinco MOB consideradas como las mejores oxidantes de Mn(II) y formadoras de biofilms.

El efecto de la temperatura sobre la cinética de la oxidación biológica de Mn(II) es especialmente relevante e importante para los sistemas de filtración porque los mismos están expuestos a variaciones de temperatura estacionales y durante el día (Bai *et al.*, 2016). Las cinco bacterias caracterizadas comienzan a oxidar Mn(II) en su fase estacionaria de crecimiento, tal como se observó para diversas MOB caracterizadas (Geszvain *et al.*, 2011; Tebo *et al.*, 1997; Toner *et al.*, 2005). Es importante destacar que una de las pruebas más estrictas que demuestra la participación de enzimas en una dada reacción química es el efecto de la temperatura, dado que estas reacciones presentan una temperatura óptima (Tebo y Emerson, 1985). Por lo tanto, los resultados presentados de oxidación en función de la temperatura sugieren que en las MOB estudiadas la reacción de oxidación de Mn(II) que ocurre está mediada enzimáticamente.

A bajas temperaturas, las velocidades de crecimiento disminuyen y se retrasa la oxidación de Mn(II) (Bai *et al.*, 2016). En este estudio, una de las bacterias caracterizadas, MOB-449, ha mostrado una temperatura óptima para la oxidación de Mn(II) de 18 °C. Las bacterias MOB-181, MOB-436 y MOB-343 también mostraron actividad oxidante de Mn(II) a 18 °C. Estos aislados resultan de gran interés como potenciales candidatos para favorecer la optimización de los procesos de filtración, donde se propone que su utilización podría llegar a jugar un rol importante en los descensos de temperaturas.

En Argentina, el Fe y el Mn a menudo se encuentran juntos en el agua subterránea (Pacini *et al.*, 2005). Por lo tanto, se evaluó la capacidad de oxidación de Mn(II) en presencia de diferentes concentraciones de ambos metales y todas las cepas analizadas tenían la capacidad de oxidar Mn(II) en concentraciones comúnmente encontradas en aguas subterráneas, y también en concentraciones extremas de estos metales. En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la oxidación de Mn(II) en las MOB aisladas se realiza mediante reacciones enzimáticas inducidas de manera dependiente del tiempo, de la temperatura y de la concentración de metales presentes en el medio de cultivo.

En este trabajo se seleccionaron bacterias específicas y adecuadas para mejorar el tratamiento de remoción biológica de Mn(II). Un resumen del

rendimiento de oxidación de Mn(II) evaluado para todas las cepas en diferentes condiciones de crecimiento se muestra en la Tabla 3.9. Existen fuertes evidencias para postular a MOB-181 como posible candidata para ensayos de bioaumentación en sistemas biológicos de eliminación de Mn. Esta bacteria fue la más versátil de todas las MOB caracterizadas y tuvo la capacidad de oxidar Mn(II) en todas las temperaturas analizadas (Tabla 3.9.). Curiosamente, mostró una buena capacidad de oxidación de Mn(II) a bajas temperaturas (18 °C), lo que sugiere que podría ser relevante durante los meses de invierno. Además, fue capaz de oxidar Mn(II) en todos los medios de cultivo analizados, en presencia de otros metales (Figura 3.10.), y pudo crecer sin inhibir el crecimiento de otras bacterias (Figura 3.11.) lo permitiría formular inóculos mixtos (Tabla 3.9.). Por otro lado, muestra una excelente capacidad formadora de biofilms y, lo que es más interesante aún, esta actividad está incrementada en presencia de Mn(II) (Figura 3.8.). Esta propiedad es esencial para colonizar la arena y para evitar la pérdida o eliminación por lavado de los filtros. Mediante secuenciación de Illumina del gen 16S ARNr se pudo determinar que esta bacteria está presente en sistemas de filtros que funcionan eficientemente removiendo el Mn(II) de aguas y, además, su cultivo y mantenimiento en el laboratorio no presentó ningún tipo de dificultades. Finalmente, fue capaz de oxidar el Mn(II) presente en el agua subterránea cuando se inmovilizó sobre la arena (Figura 3.12.). Por lo tanto, se propone a MOB-181 como principal candidata para el desarrollo de un inóculo bacteriano que pueda ser aplicado mediante estrategias de bioaumentación para optimizar los sistemas de remoción de Mn(II) de aguas subterráneas.

**Tabla 3.9. Resumen del efecto de la temperatura y los metales en las capacidades de oxidación de Mn (II) de las MOB seleccionadas.** Medio de cultivo y Temperatura: el color verde indica que la MOB puede oxidar Mn(II) y el rojo que la MOB perdió la capacidad de oxidación de Mn(II). Mn: el verde indica que la MOB puede oxidar Mn(II) en las condiciones ensayadas. Fe: el verde indica que la MOB puede oxidar Mn(II) y el rojo que la oxidación de Mn(II) se redujo a esta concentración de metal. Interacción en el crecimiento (IC): el verde indica que la MOB no inhibe el crecimiento de los otros aislamientos, el rojo indica lo contrario.

Cepa	Medio de Cultivo			Temperatura (°C)			Mn (μM)			Fe (μM)				IC
	PC	Mn	Lept	18	28	37	100	150	200	5	10	25	100	
MOB-181														
MOB-343														
MOB-436														
MOB-449														
MOB-326														



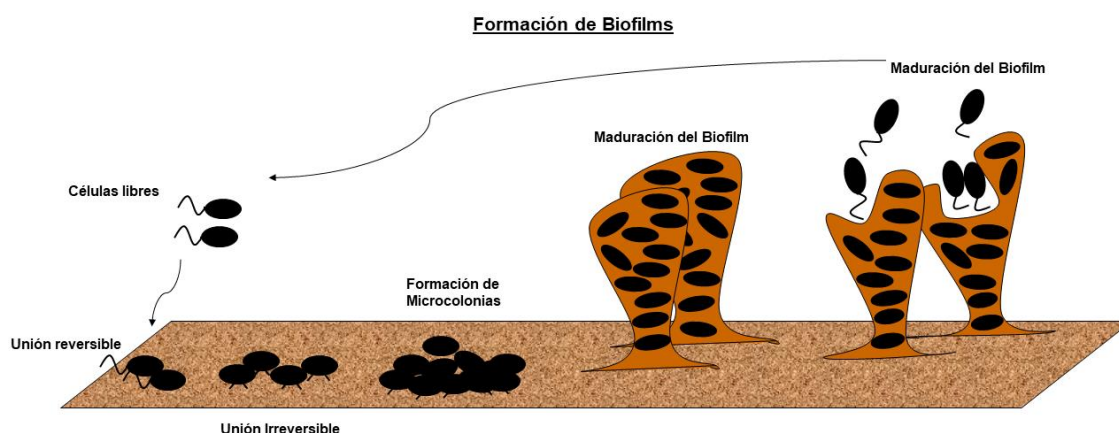
## 4 Caracterización Microscópica de la Oxidación de Mn(II) y la Formación de Biofilm en MOB

### 4.1 Introducción

#### 4.1.1 Formación de Biofilms

En sus hábitats naturales, las bacterias adoptan preferiblemente un estilo de vida sedentario en comunidades conocidas como biofilms (Costerton *et al.*, 1987). El interés en los biofilms aumentó considerablemente cuando los microbiólogos comenzaron a apreciar a las bacterias como organismos "sociales" (Serra y Hengge, 2014).

Los biofilms son sistemas dinámicos y complejos que permiten la colonización de superficies (O'Toole y Kolter, 1998a, b; Romling *et al.*, 2013). A lo largo del proceso de formación de biofilms generalmente se distinguen varias etapas (Figura 4.1.). El proceso comienza cuando las células libres entran en contacto con una superficie y se adhieren de forma reversible a ésta. A continuación, comienzan a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio inicial de unión formando una microcolonia que se adhiere irreversiblemente a la superficie. En una etapa posterior, la bacteria empieza a secretar distintos compuestos, como exopolisacáridos (EPS), proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, que constituyen la matriz de los biofilms hasta que las microcolonias quedan completamente embebidas en la misma, dando lugar a un biofilm maduro. Finalmente, el proceso concluye (o vuelve a empezar) con la liberación de algunas células móviles que van a colonizar nuevas superficies (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).



**Figura 4.1. Esquema general de la formación de Biofilms.** Modificado de (Seneviratne *et al.*, 2012).

Además de inmovilizar a las bacterias y proporcionar una estructura de soporte, la matriz atrapa nutrientes y diversas moléculas biológicamente activas, como señales de *quorum sensing*, y se comporta como un sistema de digestión externo, ya que también contiene enzimas que degradan diferentes componentes de la matriz, nutrientes u otros sustratos, poniendo los productos a disposición de las células, lo que facilita su absorción. Por otra parte, la matriz proporciona protección frente a distintos estreses ambientales, compuestos antimicrobianos, como toxinas o antibióticos, depredadores o fagocitosis (Flemming y Wingender, 2010).

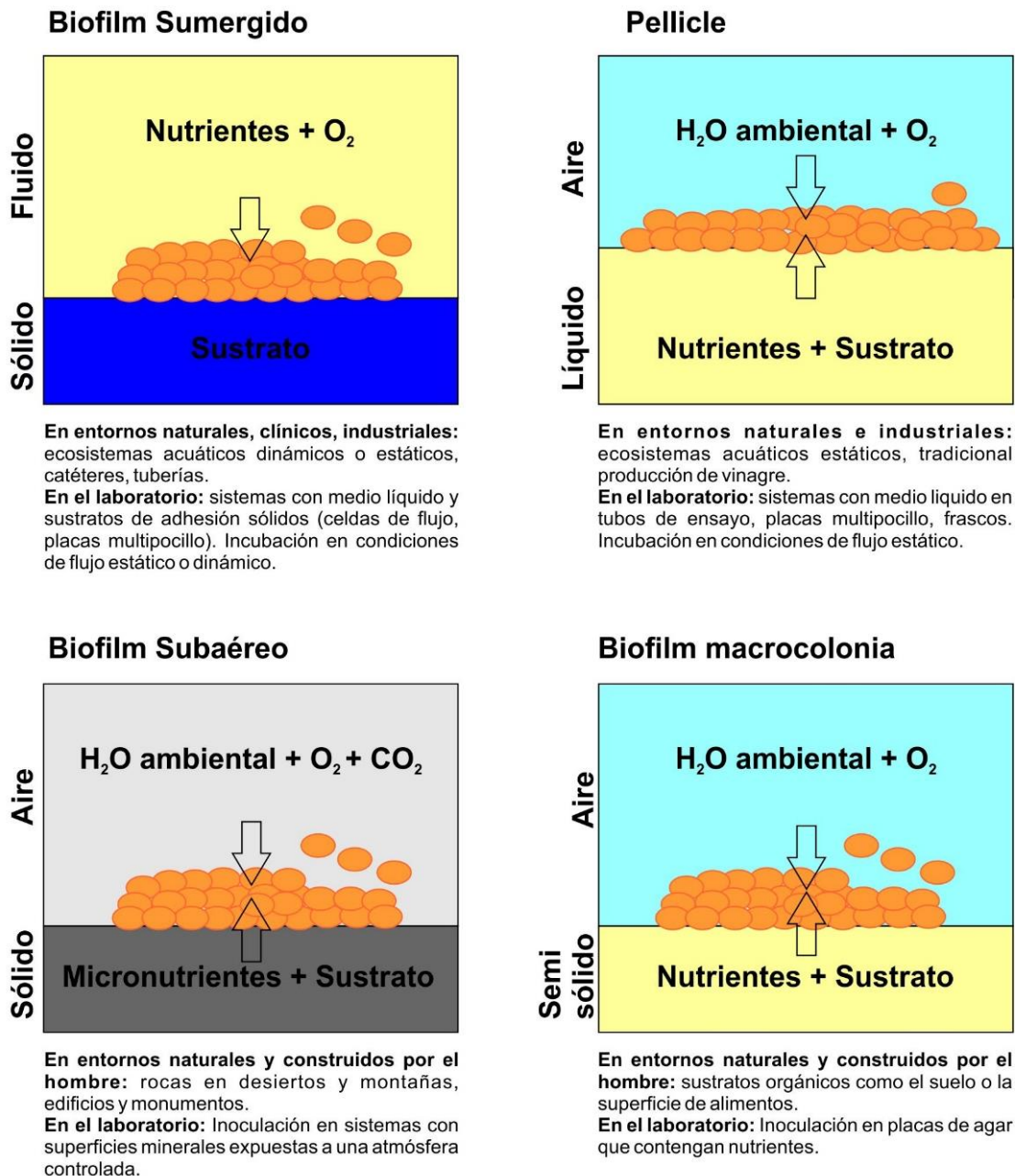
Aunque la definición canónica de biofilm incluye su asociación con una superficie sólida, hay estructuras multicelulares similares a biofilms que flotan en la interfase líquido-aire. Los requisitos para la formación de este tipo de agrupaciones, también llamado *Pellicle*, son el contacto entre células, la acumulación de EPS y, además, el crecimiento en condiciones estáticas (Ude *et al.*, 2006). La capacidad para producir biofilms en la interfase líquido-aire está muy extendida entre las cepas ambientales de *Pseudomonas* en las que la celulosa es el componente extracelular mayoritario (Ude *et al.*, 2006).

#### 4.1.2 Modelos de Biofilms Bacterianos

La gran diversidad de configuraciones de biofilms naturales se ha imitado experimentalmente utilizando una serie de modelos de biofilms, que difieren en la naturaleza del soporte de superficie del biofilm, así como en la distribución espacial de nutrientes, oxígeno y agua (Figura 4.2.). Por lo tanto, el crecimiento de biofilms en microplacas o celdas de flujo representa biofilms sumergidos que

crecen en superficies sólidas inertes que generalmente se encuentran en ambientes acuáticos naturales o en catéteres (Christensen *et al.*, 1999). Los biofilms subaéreos, que a menudo contienen cianobacterias junto con hongos, crecen también sobre soportes sólidos (por ejemplo, rocas en desiertos o edificios), los cuales pueden proporcionar micronutrientes, mientras que el aire circundante proporciona oxígeno, dióxido de carbono y agua del ambiente (Gorbushina y Broughton, 2009). Los biofilms de tipo *Pellicle*, crecen en interfases líquido-aire con nutrientes provenientes de la fase líquida (Ostrowski *et al.*, 2011; Vlamakis *et al.*, 2013). Finalmente, los biofilms de macrocolonia en placas de agar semisólidas que proporcionan nutrientes, reflejan las condiciones de los biofilms que crecen en materiales orgánicos en descomposición, como el suelo o alimentos humanos. A diferencia de las colonias clásicas que surgen de células individuales, las macrocolonias se inoculan a partir de una suspensión celular (unos pocos microlitros) en medio solidificado con agar y se cultivan durante largos períodos de tiempo (Aguilar *et al.*, 2007).

Los mecanismos por los cuales los gradientes de nutrientes, oxígeno, productos de desecho o compuestos de señalización que se acumulan dentro de un biofilm, así como las condiciones de estrés externo adicional, configuran la estructura del biofilm y conducen a la diferenciación fisiológica, han surgido recientemente como un tema importante en la investigación del biofilm (Haussler y Fuqua, 2013).



**Figura 4.2. Modelos de biofilm.** Representación esquemática de 4 ejemplos típicos de biofilms que ocurren en la naturaleza y en entornos construidos por el hombre. Adaptado de (Serra y Hengge, 2014).

Dos atributos principales hacen de las macrocolonias un modelo muy valioso para estudiar la diferenciación fisiológica y el desarrollo arquitectónico en los biofilms: (i) en la microescala, las macrocolonias presentan un nivel de organización notablemente alto, donde incluso es posible identificar distintos linajes celulares; y (ii) la morfogénesis de la macrocolonia implica la elaboración de formas tridimensionales complejas macroscópicas que están fuertemente

moduladas por diferentes condiciones ambientales o de estrés (Serra y Hengge, 2014).

#### 4.1.3 Producción y Detección de Exopolisacáridos

Como se ha mencionado anteriormente, una de las moléculas claves en la formación de biofilms bacterianos son los EPS. Se ha mostrado que existen dos clases distintas de polisacáridos de *Pseudomonas* que cumplen un rol en la formación de biofilms. Los **Polisacáridos Capsulares** mantienen las características de polímeros dinámicos protectores que revisten el exterior de una o más células. Alternativamente, los **Polisacáridos Agregativos**, ofrecen integridad estructural e interactúan con componentes de matriz adicionales. Los polisacáridos capsulares proporcionan una capa alrededor de una bacteria, mientras que los polisacáridos agregativos no lo hacen (Mann y Wozniak, 2012).

##### **Polisacáridos Capsulares:**

###### - *Alginato:*

El Alginato es uno de los EPS mejor estudiados en *Pseudomonas*. Es una importante molécula de matriz para la formación de biofilms en estas bacterias dado que proporciona mucho más que estabilidad estructural (Nivens *et al.*, 2001). Específicamente, el alginato es un polímero acetilado de alto peso molecular con monómeros no repetitivos de los ácidos L-gulurónicos y D-manurónicos unidos por enlaces  $\beta$ -1,4 (Remminghorst *et al.*, 2009). El alginato hace que las colonias se vean mucoides (Figura 4.3.), evidenciando que están encerradas en este material viscoso (Hogardt y Heesemann, 2013). Además de la función estructural, los componentes de la matriz de biofilms tienen otras funciones y, en el caso de los EPS capsulares como el alginato, poseen propiedades suficientes para la retención de agua. El biofilm que contiene alginato tiene la capacidad de sobrevivir en ambientes hostiles y al estrés por desecación, factores limitantes del ciclo de vida en el suelo bacteriano (Chang *et al.*, 2007).

###### - *Levano:*

Además del alginato, el polisacárido capsular levano es producido por un subconjunto de *Pseudomonas*, en particular, por el fitopatógeno *P. syringae* (Osman *et al.*, 1986). El levano es un polifructano  $\beta$ -2,6 de alta masa molecular

con ramificación extensa a través de enlaces  $\beta$ -2,1 (Laue *et al.*, 2006). Se produce exclusivamente a partir de sacarosa en el exterior celular (Osman *et al.*, 1986). Se especula que el levano funciona como una molécula de almacenamiento en *P. syringae*, que posiblemente actúa como almacén de nutrientes (Laue *et al.*, 2006). Esta función es muy interesante dado que proporcionaría a un microorganismo ambiental una fuente de reserva fácilmente disponible para las ocasiones en que otros nutrientes se agoten (Mann y Wozniak, 2012).

### **Polisacáridos Agregativos:**

#### **- *Psl* (*polysaccharide synthesis locus*):**

Psl está compuesto de D-manosa, D-glucosa y L-ramnosa. Comúnmente se lo encuentra en al menos dos formas: un componente asociado a células de alto peso molecular, y una forma soluble relativamente más pequeña que se puede aislar del sobrenadante de cultivo de células libres (Byrd *et al.*, 2009). Se produce durante el crecimiento planctónico, es extremadamente importante para la adhesión inicial de células a las superficies y contribuye a la formación de las microcolonias. En los biofilms maduros, Psl ayuda a la estabilidad estructural y la arquitectura final (Ma *et al.*, 2009).

#### **- *Pel***

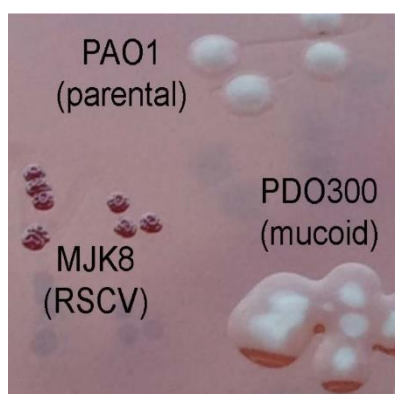
La composición y la naturaleza del polisacárido Pel no están definidas (Mann y Wozniak, 2012). Es un polímero esencial para la formación de la pellicle en la interfaz aire-líquido y causa agregación en los medios de cultivo de laboratorio (Friedman y Kolter, 2004a). Asimismo, se ha demostrado que Pel desempeña un papel en las interacciones célula-célula en los biofilms de la cepa PA14 de *P. aeruginosa*, proporcionando un soporte estructural para la comunidad en las etapas iniciales de formación de biofilm (Colvin *et al.*, 2011).

#### **- *Celulosa*:**

La celulosa es otro EPS sintetizado por un gran número de cepas ambientales (Ude *et al.*, 2006). Es un homopolímero lineal de moléculas de D-Glucosa unidas por enlaces  $\beta$ (1-4) y sintetizado por un complejo proteico anclado a la membrana (Whitney y Howell, 2013).

La producción de estos EPS agregativos puede detectarse e incluso cuantificarse mediante el uso de agentes de tinción. El Rojo Congo (RC) es un colorante que, añadido a las placas de medio sólido tiene la capacidad para unirse a proteínas y a varios EPS (aunque no a todos), tales como celulosa (Serra *et al.*, 2013a; Spiers *et al.*, 2002) o los polisacáridos Pel y Psl de las cepas de *P. aeruginosa* (Mann y Wozniak, 2012; White y Surette, 2006).

A modo ilustrativo, la Figura 4.3. muestra los fenotipos correspondientes a tres cepas de *P. aeruginosa* diferentes (PAO1, PDO300 y MJK8) crecidas en presencia de RC. La cepa PDO300 se muestra como ejemplo de cómo la producción del polisacárido alginato hace que las colonias parezcan encerradas dentro de un material viscoso, en comparación con las cepas no mucoides, PAO1, y MJK8 (Hogardt y Heesemann, 2013). La cepa MJK8, sobreproductora de EPS agregativos, muestra cómo estos EPS se tiñen con RC y el fenotipo rugoso que se observa cuando las cepas producen este tipo de EPS, también llamado fenotipo RSCV (Mann y Wozniak, 2012) (Figura 4.3.).



**Figura 4.3. Variaciones morfológicas de colonias de *Pseudomonas aeruginosa*.** Los cultivos de las cepas PAO1 (parental), MJK8 (fenotipo RSCV) y PDO300 (fenotipo mucóide) se sembraron en medio de cultivo suplementado con RC. La cepa MJK8 produce EPS agregativos y la cepa PDO300 EPS capsulares. Todas las cepas crecen a tasas similares, sin embargo, las colonias MJK8 son pequeñas y más agregativas, y las colonias PDO300 son mucoides. PAO1 tiene colonias lisas bien definidas. Adaptado de (Mann y Wozniak, 2012).

El análisis de los elementos de EPS también se puede facilitar mediante el uso de colorantes fluorescentes que permiten la tinción de los componentes de la matriz. Los colorantes fluorescentes que tiñen EPS se unen a los mismos con afinidades variables y diferentes colores fluorescentes. El CalcoFlúor (CF), se utiliza para identificar EPS agregativos, dado que se une de manera más

específica a polisacáridos con enlaces glucosídicos  $\beta(1-4)$  y  $\beta(1-3)$  presentes, por ejemplo, en la celulosa y hace que las colonias positivas emitan fluorescencia bajo luz ultravioleta (Spiers *et al.*, 2002). Por otro lado, la Tioflavina S (TS) muestra una fuerte fluorescencia verde tras la unión eficaz a algunos EPS agregativos, como celulosa (Serra *et al.*, 2013a; Serra *et al.*, 2013b).

#### 4.1.3.1 Ensayos de Morfología de Macrocolonia en Agar

Una característica destacada de los biofilms de macrocolonia es que pueden adoptar morfologías complejas comúnmente conocidas como "arrugadas", "rugosas" o "rdar" (por red (rojo), dry (seco) y rough (rugoso)) que incluyen distintos elementos morfológicos como "crestas", "arrugas" y "anillos" (Aguilar *et al.*, 2007; Mann y Wozniak, 2012; Romling, 2005; Serra *et al.*, 2013a). Actualmente se sabe que estos fenotipos morfológicos dependen de componentes específicos de EPS (Friedman y Kolter, 2004b; Romero *et al.*, 2010; Serra *et al.*, 2013a; Zogaj *et al.*, 2001) y esta relación es el principio subyacente de los ensayos de morfología de macrocolonia en agar. Este ensayo además aprovecha la capacidad que tienen los colorantes RC, CF y TS que se agregan al medio de agar, y que tienen la capacidad para unirse a los EPS, sin una influencia notable en el crecimiento bacteriano o la morfogénesis del biofilm (Chapman *et al.*, 2002; Hammar *et al.*, 1995; Reichhardt *et al.*, 2015; Zogaj *et al.*, 2001).

Debido a las diferencias en su espectro de absorbancia tras la unión a exopolisacáridos, el RC conduce a patrones de color específicos. A modo de ejemplo, se muestran los biofilms de macrocolonias de la cepa PA14 de *P. aeruginosa*, los cuales muestran un color rojo oscuro en placas de agar en presencia de RC, mientras que los mutantes que no producen EPS agregativos son de color rosa pálido (Figura 4.4.). Las colonias de tipo salvaje muestran una morfología "rugosa", mientras que las colonias mutantes son suaves (Figura 4.4.) (Friedman y Kolter, 2004a).





**Figura 4.4. Morfología de la macrocolonia de *P. aeruginosa* PA14 de tipo salvaje y mutantes que no producen Pel, cultivadas en placas de RC.** Adaptado de (Friedman y Kolter, 2004a).

Finalmente, dado que los biofilms de macrocolonia muestran un nivel notablemente alto de organización estructural a microescala, son un sistema modelo muy valioso para estudiar la arquitectura tridimensional dentro de un biofilm (Serra y Hengge, 2017). Actualmente, es posible realizar una inspección de cerca en la anatomía de la macrocolonia a partir de la combinación de dos técnicas: crio-seccionamiento y posterior análisis de imágenes microscópicas. Si bien la crio-sección se aplicó bastante temprano en el contexto de la investigación de biofilms (Yu *et al.*, 1994), su uso para estudiar macrocolonias comenzó hace relativamente poco tiempo (Hobley *et al.*, 2013; Serra *et al.*, 2013a; Serra *et al.*, 2013b; Werner *et al.*, 2004). Al realizar cortes finos a través de la macrocolonia, se puede examinar de cerca las zonas internas de los biofilms que son tan estructurados que de otro modo resultan muy difíciles de visualizar mediante técnicas de microscopía (Vlamakis *et al.*, 2008).

#### **4.1.4 Relación entre la Formación de Biofilms, la Producción de EPS y la Oxidación de Mn(II)**

La relación entre el proceso de formación de biofilms y el de oxidación de Mn(II) no ha sido estudiada en profundidad hasta el momento y, sin embargo, como se mencionó anteriormente, se considera un enfoque clave para tratar de optimizar los procesos biotecnológicos de remoción del metal y para comprender la biogeoquímica del Mn en la naturaleza.

En todas las MOB caracterizadas por microscopía electrónica de transmisión se ha observado que la acumulación de óxidos de Mn ocurre en la superficie celular (Emerson y Ghiorse, 1992; Okazaki *et al.*, 1997). Por lo tanto, se hipotetiza que la/s proteína/s oxidante/s de Mn(II) se encuentra/n en la región

más externa de la célula y es ahí donde se produce la actividad oxidante y que podría existir una relación entre los EPS presentes en la superficie celular y la localización y/o retención de las enzimas oxidantes de Mn(II) en esta superficie.

Teniendo en mente el objetivo de optimizar la eliminación de Mn(II) de aguas, en este Capítulo se tomó a la bacteria MOB-181 como modelo para estudiar el vínculo entre la oxidación de Mn(II) y producción de EPS en el interior de un biofilm bacteriano ya que ambos procesos son importantes para la aplicación biotecnológica. Particularmente, se utilizó el enfoque de crio-seccionamiento/microscopía, para estudiar la arquitectura de los biofilms de macrocolonia de MOB-181 cultivada en presencia o ausencia de Mn(II) y se logró determinar la localización de los óxidos de Mn dentro del biofilm. Por otro lado, se caracterizaron los EPS producidos por MOB-181, a fin de determinar si los mismos desempeñan un papel en la configuración de la arquitectura de los biofilms de MOB, en presencia o ausencia de MnOx en el medio. Dado que las macrocolonias muestran un nivel notablemente alto de organización estructural, se lo utilizó como modelo para estudiar no sólo la producción sino también el ensamblaje arquitectónico tridimensional de EPS dentro del biofilm. Finalmente, se realizaron ensayos de actividad *in gel* para tratar de localizar la actividad oxidante de Mn(II) en MOB-181 a fin de relacionar los mecanismos involucrados en la formación de biofilms y en la oxidación de Mn(II).

## **4.2 Materiales y Métodos**

### **4.2.1 Crecimiento de Macrocolonias**

Las células se cultivaron durante la noche en medio LB líquido con agitación a 28 °C. Se realizaron diluciones ( $DO_{600nm}=0,1$ ) y se sembraron gotas de 5 µL de las mismas en placas de agar Lept en presencia y ausencia de Mn(II). Cuando se indica, las placas de agar se complementaron con Rojo Congo (RC; 50 µg mL<sup>-1</sup>) o Tioflavina S (TS; 40 µg mL<sup>-1</sup>) o CalcoFlúor (CF; 100 µg mL<sup>-1</sup>). Las placas con macrocolonias se incubaron a 28 °C hasta 7 d.

#### 4.2.2 Estereomicroscopía

Se realizaron inspecciones diarias de la morfología de los biofilms de macrocolonia de MOB-181 y, cuando se indica, de MOB-513. Los mismos se visualizaron a un aumento 1X y 5X con un estereomicroscopio Stemi 2000-C (Zeiss, Oberkochen, Alemania). Las imágenes digitales se capturaron con una cámara digital AxioCam-ICC3 acoplada al estereomicroscopio, operada a través del software AxioVision 4.8 (Zeiss).

#### 4.2.3 Crio-sección de Biofilms de Macrocolonia y Microscopía de Fluorescencia

La crio-sección de biofilms se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito previamente (Serra y Hengge, 2017). Brevemente, se cortaron bloques de agar que contenían los biofilms de macrocolonia, se colocaron en un molde descartable (Tissue-Tek), se cubrieron con un agente para embeber (compuesto Tissue-Tek OCT) y se congelaron rápidamente en Nitrógeno líquido. Los biofilms de macrocolonia crioembebidos fueron seccionados usando un criostato HM560 (Thermo Fisher Scientific) establecido a una temperatura de -20 °C. Se obtuvieron secciones de 5 µm de espesor perpendiculares al plano de la macrocolonia utilizando cuchillas Sec35 desechables (Thermo Fisher Scientific). Las secciones se colocaron en portaobjetos de microscopio recubiertos con polilisina (Superfrost Plus; Fisher Scientific). Al otro día, se añadió reactivo Mowiol a los portaobjetos como medio de montaje.

La detección de la oxidación de Mn(II) *in situ* en los biofilms de macrocolonia se realizó mediante el uso del microscopio Axioskop 2 (Zeiss, Oberkochen, Alemania) mediante campo brillante y las muestras se visualizaron con un aumento de 50X de magnificación. Para la detección de fluorescencia de Tioflavina S unida en las secciones de biofilms se utilizó el mismo microscopio con las siguientes configuraciones de filtro: para TS, excitación=436 BP/ 20 nm, emisión=535 BP/ 30 nm. Las muestras se visualizaron con una magnificación de 200X o 1000X.

Para todos los casos, las imágenes digitales se capturaron con una cámara digital AxioCam MRm acoplada al microscopio Axioskop 2 utilizando el software AxioVision 4.8 (Zeiss). Donde se indica, las imágenes de fluorescencia se superponen con imágenes de contraste de fases para mostrar mejor la ubicación

de la fluorescencia en las secciones de biofilm. Se incluyeron secciones de biofilms de colonias cultivadas en ausencia de TS en cada experimento respectivo como control para determinar la fluorescencia de fondo para TS.

#### **4.2.4 Ensayos de Actividad Oxidante de Mn(II) *in gel***

##### **4.2.4.1 Inducción de la Expresión de Proteínas Recombinantes en *E. coli***

La enzima CueO es una proteína oxidasa de Mn(II) periplasmática de *E. coli*. Estudios previos han mostrado que esta enzima tiene la capacidad de oxidar Mn(II) y producir óxidos de Mn, simultáneamente, tanto *in vitro* como *in vivo* (Su, J., *et al.*, 2014). La expresión de la proteína recombinante CueO, se llevó a cabo mediante la inducción de la expresión de las mismas en cultivos de la cepa DH5 $\alpha$ -pUH-cueO (CueO) (disponible en el laboratorio) por el agregado del inductor IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido). Para estos ensayos se incluyeron también la cepa mutante del gen *cueO*: DH5 $\alpha$ -pUH-cueO::Kn ( $\Delta$ CueO) como control negativo y la DH5 $\alpha$  como control de cepa salvaje, también disponibles en el laboratorio. Brevemente, las bacterias se cultivaron en medio LB conteniendo los antibióticos correspondientes a 37 °C con agitación constante hasta saturación del medio de cultivo. Luego, se hizo una dilución 1:100 en el mismo medio y se incubaron a 37 °C hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0,7 - 1,0 a 600 nm. La inducción de la proteína CueO en la cepa DH5 $\alpha$ -pUH-cueO se hizo a una concentración de IPTG final de 0,5 mM a 28 °C durante 3 h. Las células se cosecharon por centrifugación a 5000 g, a 4 °C durante 15 min. El pellet celular se resuspendió inmediatamente para proceder a la preparación de los extractos proteicos.

##### **4.2.4.2 Obtención de extractos proteicos de *E. coli***

Las células de *E. coli* provenientes de cultivos inducidos fueron resuspendidas en 1 mL de solución de lisis celular conteniendo Hepes 10 mM pH=7,5 y PMSF 1 mM. Después de la ruptura celular mediante sonicación, los lisados fueron clarificados por centrifugación a 12000 g, a 4 °C durante 30 min. Las muestras se sembraron por duplicado en un mismo gel y se realizaron

análisis de actividad de la oxidasa de Mn(II) y tinción con Coomassie Blue Coloidal (descriptos a continuación **4.2.4.4**).

#### **4.2.4.3 Obtención de Extractos Proteicos de MOB-181**

Se creció un cultivo de la cepa MOB-181 durante 16 h en medio LB líquido a 28 °C, luego se diluyó el cultivo a una  $DO_{600nm}=0,1$  y se sembraron 100  $\mu$ L en placas de medio Lept, que contenían  $MnSO_4$  100  $\mu$ M. Al cabo de 3 d de incubación a 28 °C, los pastos de células provenientes de cinco placas fueron removidos con un ansa y resuspendidos en 1 mL de buffer Hepes 10 mM, pH=7,5. Se vortexeó vigorosamente durante 10 min y se centrifugó 10 min a 5000 g para bajar la células y recuperar el sobrenadante al cual se denominó fracción de proteínas secretadas (Fracción 1). El pellet de células se resuspendió luego en 1 mL de buffer Hepes 10 mM, pH=7,5 y PMSF 1 mM. Posteriormente se sonicó y se centrifugó 15 min a 10000 g para recuperar la fracción de proteínas solubles en el sobrenadante (Fracción 2) y la fracción de restos celulares en el pellet (Fracción 3). Los patrones proteicos de las distintas fracciones celulares de MOB-181 fueron analizados en geles de poliacrilamida en ausencia de SDS, con algunas modificaciones. Las muestras se sembraron por duplicado en un gel y se realizaron análisis de actividad de la oxidasa de Mn(II) y tinción con Coomassie Blue Coloidal (descriptos a continuación **4.2.4.4**).

#### **4.2.4.4 Electroforesis de Proteínas en Geles de Poliacrilamida Nativos, Ensayos de Actividad Oxidante de Mn(II) y Tinción con Coomassie Blue Coloidal**

Los patrones proteicos fueron analizados en geles de poliacrilamida en ausencia de SDS. La concentración final de acrilamida en los geles de separación se ajustó en un 12 % debido al tamaño de las proteínas a separar. Antes de la siembra, las muestras fueron resuspendidas en solución de siembra conteniendo Azul de Bromofenol 0,005 % (p/v); EDTA 1 mM; y glicerol 5 % (v/v) y centrifugándolas a 15000 rpm por 2 min. Las electroforesis se desarrollaron a 4 °C en equipos Miniprotean III (Bio-Rad) a una intensidad constante de corriente aplicada de 20 mA por gel de 0,75 mm de espesor. Las muestras se sembraron por duplicado en un mismo gel y los patrones proteicos resultantes de la electroforesis fueron visualizados:

a) Mediante ensayo de actividad: los geles fueron incubados por 30 min en un buffer (pH=7,5; Tritón X-100 0,5 %, glicerol 10 % (v/v)) y posteriormente en Hepes 10 mM (pH=7,5; MnCl<sub>2</sub> 200 µM y CuSO<sub>4</sub> 100 µM). El proceso de oxidación pudo seguirse visualmente mediante la aparición de bandas de óxidos de Mn de color marrón en el gel, las cuales aparecen usualmente luego de 24 h de incubación a 37 °C. Posteriormente, para verificar que las bandas observadas efectivamente correspondían a óxidos de Mn y no de Cu, se incubó el gel con LBB.

b) Mediante tinción Coomassie Blue Coloidal: fijación (ácido acético 10 % (v/v)), posterior tinción con Azul Brillante de Coomassie R-250 y decoloración de los geles de acuerdo al protocolo descrito en (Sambrook *et al.*, 1989). Las siguientes soluciones se prepararon utilizando reactivos de alta calidad, libre de queratinas y contaminantes. Se utilizaron guantes y recipientes limpios.

-Solución fijadora: 30 % (v/v) EtOH; 2 % (v/v) ácido fosfórico

-Solución de tinción: 18 % (v/v) MeOH, 17 % (p/v)(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 % (v/v) ácido fosfórico

Se fijaron las proteínas dejando el gel en solución fijadora durante 3 h. Luego se realizaron tres lavados durante 30 min con H<sub>2</sub>O destilada. Se agregó la solución de tinción y se dejó en agitación durante 1 h. Luego se adicionó 0,5 g L<sup>-1</sup> de Coomassie Blue G-250 en polvo al gel en la solución de tinción. Se dejó agitar suavemente por 2 d en un recipiente tapado para evitar evaporación y contaminación. Se realizó un lavado del gel con H<sub>2</sub>O destilada y se cortó la banda de interés lo antes posible. Las mismas se mandaron a analizar al Servicio de Identificación de Proteínas por MS y MS-MS de organismos con genomas secuenciados que ofrece el CEQUIBIEM (<http://cequibiem.qb.fcen.uba.ar/>).

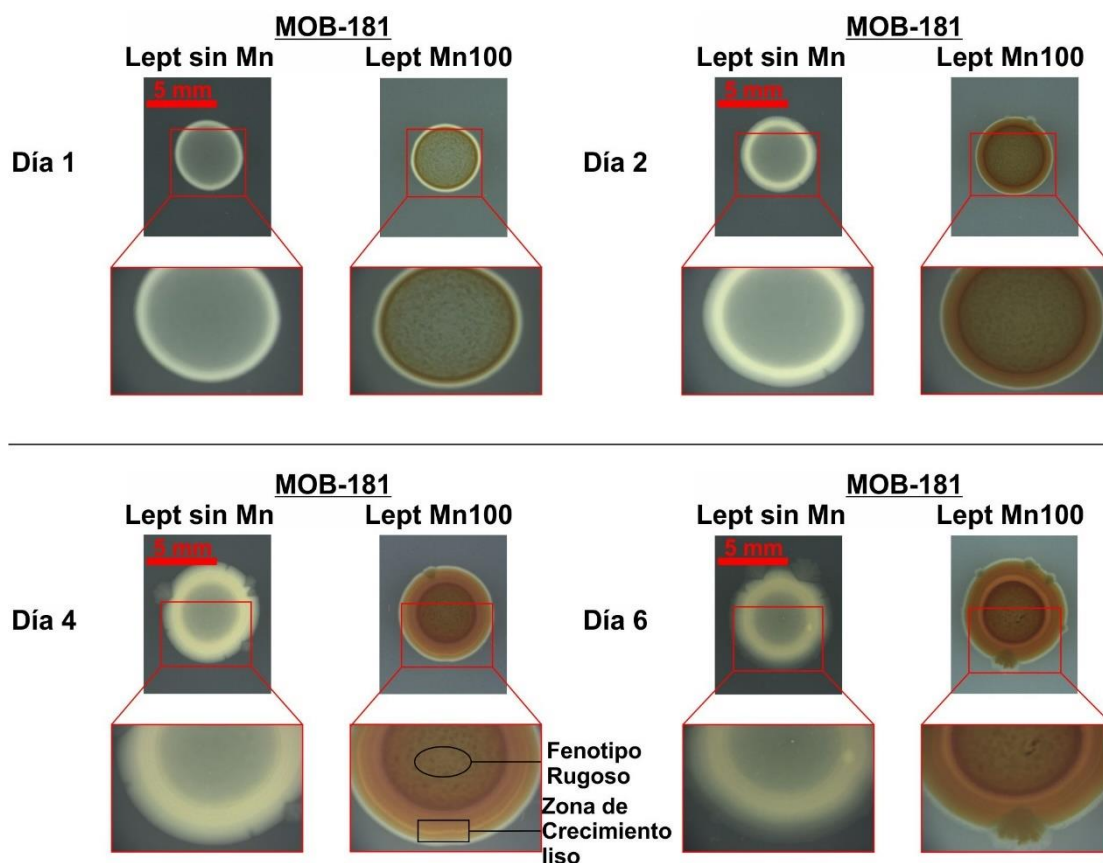
### 4.3 Resultados

Los ensayos de biofilms de macrocolonia que se describen en esta sección, se realizaron en colaboración con el Dr. Diego Serra y la Prof. Dra. Regine Hegge, en la Universidad Humboldt, Berlín, Alemania. El grupo liderado por la Prof. Hengge tiene reconocimiento internacional y amplia experiencia en el uso

de macrocolonias como sistema modelo para el estudio de la formación de biofilms en *E. coli*.

#### **4.3.1 Estudio de la Morfología de las Macrocolonias de MOB-181 y Producción de EPS**

En primer lugar, se evaluó la existencia de variaciones en la arquitectura de los biofilms en presencia o ausencia de Mn(II) en el medio. Para ello, se crecieron las macrocolonias de MOB-181 a 28 °C en placas de medio Lept y, a distintos tiempos, se examinó el fenotipo de la oxidación de este metal. Tal como se muestra en la Figura 4.5., la oxidación es visible a partir de las primeras 24 h de incubación de las macrocolonias y, a lo largo de los días, se pudo ver que la densidad de células en la macrocolonia aumentó, así como también la acumulación de MnOx. Asimismo, se observó que las macrocolonias desarrollaron una morfología compleja (Figura 4.5.). Tanto en presencia como en ausencia de Mn(II) en el medio, la región externa de la macrocolonia se caracterizó por una zona estrecha de crecimiento liso (indicado con un recuadro en el día 4 de crecimiento en la Figura 4.5.). En presencia de Mn(II), esta zona estuvo seguida hacia el centro de la macrocolonia por una zona de fenotipo rugoso (indicado con un recuadro en el día 4 de crecimiento en la Figura 4.5.). Sin embargo, en ausencia de Mn(II), la zona central de la macrocolonia no mostró ningún fenotipo morfológico.

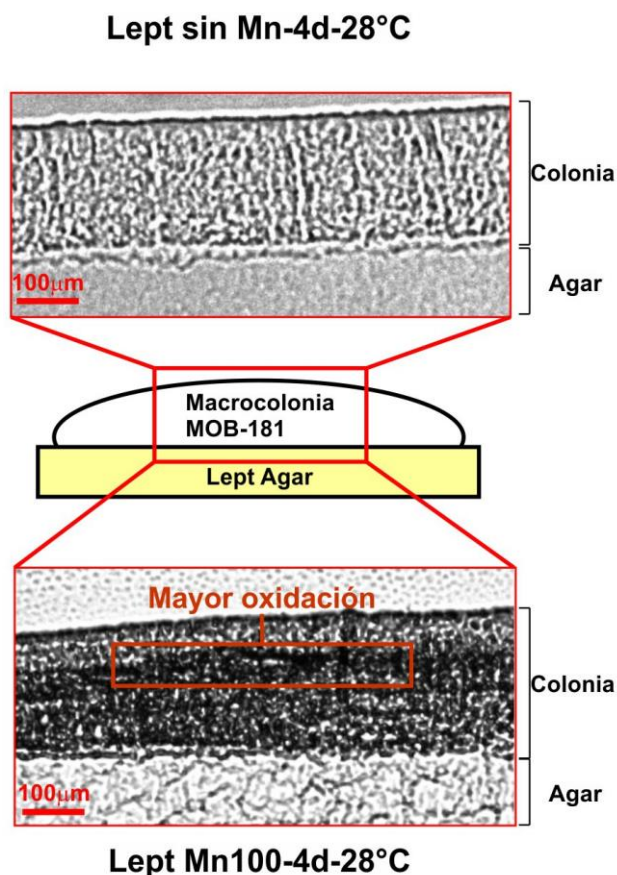


**Figura 4.5. Apariencia de las macrocolonias de MOB-181 crecida en presencia y ausencia de Mn(II).** Se muestra la morfología de las macrocolonias luego de 1, 2, 4 y 6 d de incubación en Lept sin Mn y en presencia de Mn(II). Las cepas se crecieron durante 6 d a 28 °C en placas de medio Lept suplementadas con Mn 100  $\mu$ M (Lept Mn100) o sin suplementar (Lept sin Mn). Los paneles inferiores muestran una magnificación de las imágenes de las macrocolonias de los paneles superiores. Al cuarto día se indican las zonas correspondientes al área de crecimiento liso de la macrocolonia y el fenotipo rugoso descrito como principales características en presencia de Mn en el medio. Para la visualización y grabación de imágenes se utilizó un estereomicroscopio acoplado a una cámara digital.

Posteriormente, se realizó el crioseccionamiento y análisis microscópico de las macrocolonias, lo cual permitió obtener detalles de la disposición espacial de la oxidación de Mn(II) dentro de las mismas. En la Figura 4.6., se muestran los resultados del crioseccionamiento de MOB-181 luego de 4 d de crecimiento en Lept, en presencia y en ausencia de Mn(II). En presencia de Mn(II), se observó una mayor intensidad del color debido a la acumulación de óxidos de Mn. Asimismo se detectaron zonas donde la oxidación de Mn(II) fue más pronunciada (indicados con un recuadro en el interior de la macrocolonia en la Figura 4.6.). Se muestran los resultados al día 4, dado que fue el tiempo de incubación necesario para la detección de la producción de EPS, tal como se describe más



adelante. Asimismo, en este tiempo se alcanza la máxima oxidación de Mn(II) en MOB-181 (Capítulo 3, Figura 3.7.B).

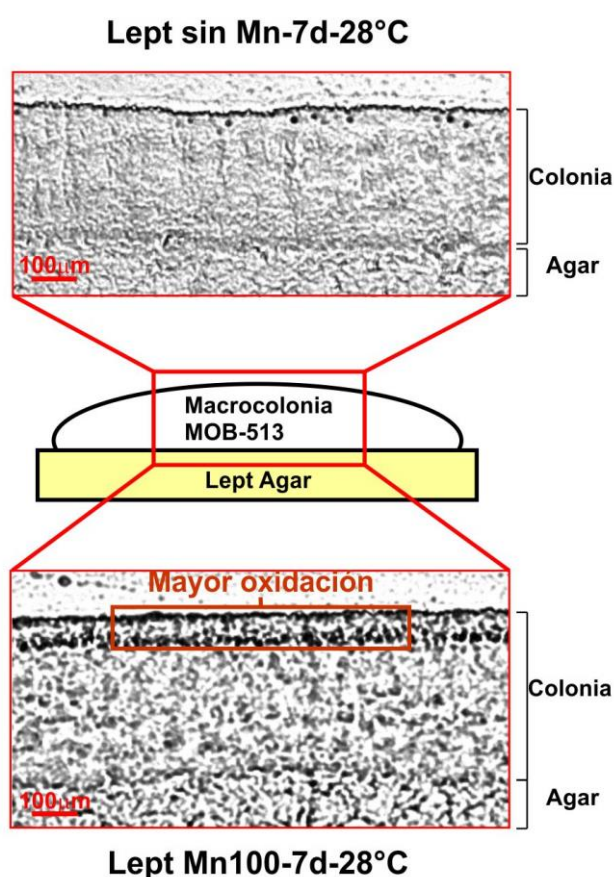


**Figura 4.6. Distribución espacial de la oxidación de Mn(II) de biofilms de MOB-181.** Los biofilms de macrocolonia de MOB-181 de 4 d cultivados en medio Lept suplementado con Mn(II) 100 μM (Lept Mn100, panel inferior) o sin Mn(II) (Lept sin Mn, panel superior) se crioseccionaron perpendicularmente al plano de la macrocolonia con un espesor de 5 μm. Las delgadas secciones se visualizaron por microscopía de campo brillante con una magnificación de 50X. Las imágenes muestran la sección vertical completa de la mitad de las macrocolonias. Y en el medio de la figura se representó esquemáticamente una sección de la colonia a fin de visualizar la zona perteneciente a las imágenes microscópicas de los cortes mostradas. Además se señala en cada fotografía la zona correspondiente al Lept agar y la zona correspondiente a la colonia. En el caso de la macrocolonia proveniente de Lept Mn100 se indica con un recuadro la zona donde se detectó mayor acumulación de óxidos.

Tal como se observa en la Figura 4.6., la distribución de la oxidación de Mn(II) dentro de la colonia de MOB-181 es bastante homogénea, aunque se destacan algunas áreas donde la oxidación es mayor. A modo comparativo, se incluyó otra cepa bacteriana en estos estudios a fin de determinar si la distribución de la oxidación era similar a la de MOB-181. En la Figura 4.7., se puede observar el fenotipo de la macrocolonia de MOB-513, una cepa descripta

previamente en el Capítulo 3, luego de 7 d de crecimiento a 28 °C en medio Lept en presencia y en ausencia de Mn(II). En este caso, se observó una única zona de la colonia con capacidad de oxidación de Mn(II) y correspondiente con una fracción de células localizada en la parte superior de la macrocolonia, la cual estuvo ausente en los cortes de las macrocolonias de MOB-513 crecidos en ausencia de Mn(II) en el medio (Figura 4.7.). Para MOB-513 se muestran los cortes correspondientes al tiempo donde se alcanzó la máxima oxidación de la macrocolonia, 7 d (Capítulo 3, Figura 3.7.B). Es importante aclarar que se siguió la oxidación de esta bacteria a lo largo de los días y la máxima oxidación detectada en esta cepa es la que se muestra al día 7.

Una observación importante a tener en cuenta es el tamaño de las macrocolonias. Se puede apreciar que el espesor de la macrocolonia de MOB-513 (~400µm) es aproximadamente el doble de la de MOB-181 (~200µm).



**Figura 4.7. Distribución espacial de la oxidación de Mn(II) de biofilms de MOB-513.**

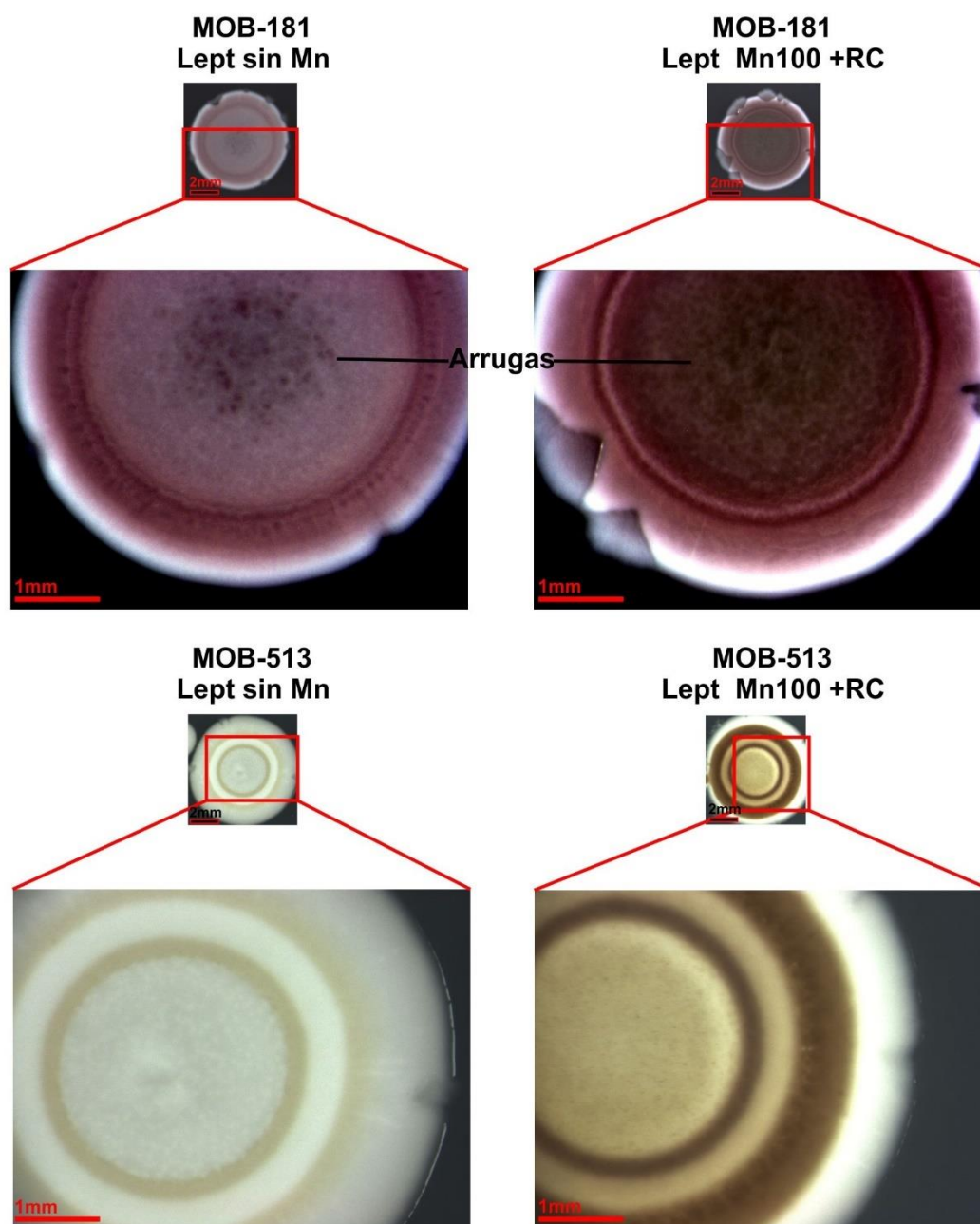
Los biofilms de macrocolonia de MOB-513 de 7 d cultivados en medio Lept suplementado con Mn(II) 100 µM (Lept Mn100, panel inferior) o sin Mn(II) (Lept sin Mn, panel superior) se muestran en las mismas condiciones que se indican para MOB-181 (Figura 4.6).

### **4.3.2 Caracterización de la Producción de Exopolisacáridos en las Macrocolonias de MOB-181**

A fin de evaluar la producción de EPS y de determinar la estructura tridimensional de los mismos en los biofilms de macrocolonias se realizaron tinciones con los reactivos descriptos previamente.

#### **- Tinción con Rojo Congo (RC)**

Las macrocolonias de MOB-181 crecidas en medio Lept, en presencia de RC, mostraron una coloración rojiza (Figura 4.8.) en comparación al crecimiento sin este colorante (Figura 4.5.). Esta tinción ocurrió tanto en presencia como en ausencia de Mn(II) (Figura 4.8.), sugiriendo en primer lugar, la secreción de EPS por parte de esta bacteria y, en segundo lugar, que la misma es independiente de la presencia de Mn(II) en el medio. En la Figura 4.8. se incluyó como control negativo la imagen de MOB-513 crecida en las mismas condiciones. Se puede observar que, a diferencia de MOB-181, las macrocolonias de MOB-513 no se tiñeron con el colorante, y no mostraron ninguno de los fenotipos característicos de las cepas productoras de EPS, incluso después de 7 d de incubación por lo que se lo declaró negativo para la producción de EPS. La tinción permitió ver que MOB-181 crecida en ausencia de Mn(II) también presenta un fenotipo rugoso en el centro de la colonia que no se había detectado en ausencia de este colorante (Figura 4.5.), aunque en menor medida respecto de la macrocolonia crecida en un medio suplementado con Mn(II) (Figura 4.8.). Este fenotipo está asociado a la presencia de EPS de tipo agregativos, como Psl o celulosa detectado en otras cepas del mismo género (Figuras 4.3. y 4.4.). Finalmente, no se observó el aspecto viscoso típico de las *Pseudomonas* productoras de alginato (Figura 4.3.) en las macrocolonias de MOB-181 y MOB-513.



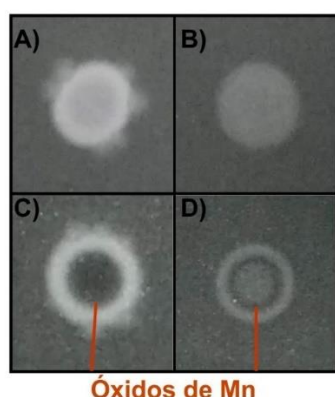
**Figura 4.8. Apariencia de las macrocolonias de MOB-181 y MOB-513 crecidas en presencia de RC.** Se muestra la morfología de las macrocolonias de MOB-181 y MOB-513 luego de 4 y 7 d de incubación a 28 °C, respectivamente, en Lept sin Mn o suplementado con Mn 100  $\mu$ M (Lept Mn100) + RC (40  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>). Los paneles inferiores muestran una magnificación de las imágenes de las macrocolonias de los paneles superiores. Para visualización y grabación de imágenes se utilizó un estereomicroscopio acoplado a una cámara digital.

#### - Tinción con Calcoflúor

También se evaluó el crecimiento de MOB-181 en presencia del colorante CF y se observó que, tanto las colonias crecidas en presencia como en ausencia

de Mn(II), tenían la capacidad de emitir fluorescencia bajo luz UV (Figura 4.9.). En estos ensayos se evaluó en paralelo a la cepa MOB-513. Como se muestra en la Figura 4.9., resultó ser un control negativo para la tinción con CF. Se puede observar que, a diferencia de MOB-181, las macrocolonias de MOB-513 no emiten fluorescencia bajo luz UV.

En el centro de las colonias de MOB-181 y MOB-513 crecidas con Mn(II) se observó un centro oscuro correspondiente a la acumulación de los óxidos de Mn(II), señalado en la Figura 4.9. para un mejor reconocimiento.



**Figura 4.9. Apariencia de las macrocolonias de MOB-181 y MOB-513 en presencia de CF.** Las colonias de MOB-181 y MOB-513 se crecieron durante 4 y 7 d, respectivamente, a 28 °C en placas de medio Lept en presencia y ausencia de Mn(II), suplementadas con CF (100µg mL<sup>-1</sup>) y se fotografiaron bajo luz UV. En A) y B) se muestra el fenotipo de MOB-181 y de MOB-513 en Lept sin Mn(II), respectivamente, en el medio suplementado con CF. En C) y D) se muestra el fenotipo de MOB-181 y MOB-513 en placas con Mn(II), respectivamente, en el medio suplementado con CF. En ésta última condición se señala la zona correspondiente a los depósitos de MnOx.

#### - Tinción con Tioflavina S (TS)

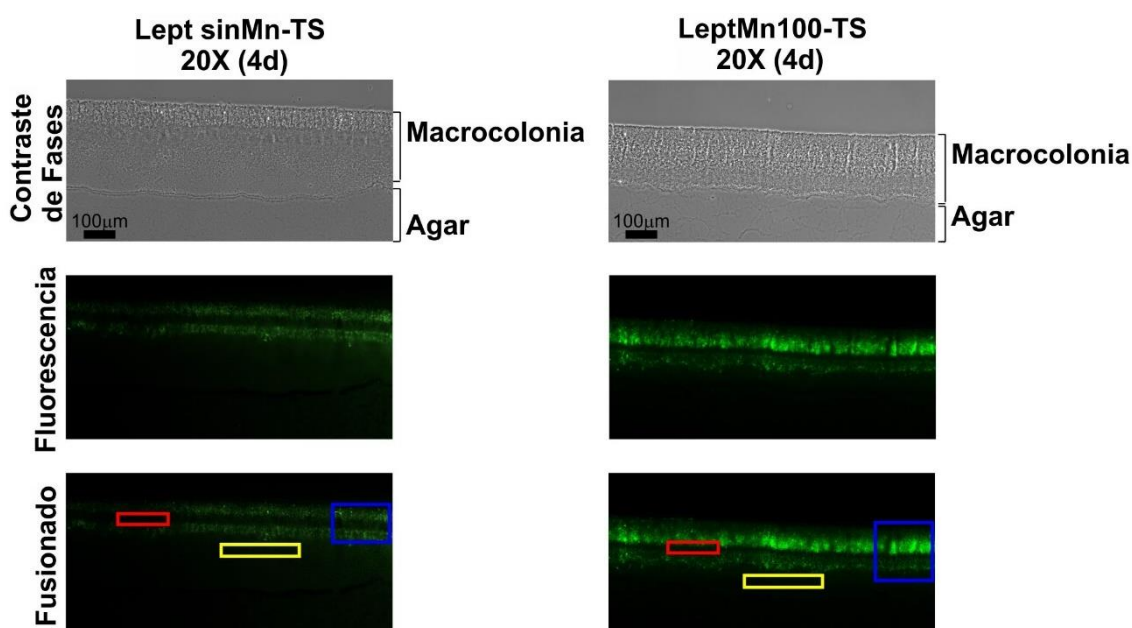
Con el fin de determinar la localización *in situ* de los EPS dentro de la macrocolonia, se decidió utilizar el enfoque de criosección/microscopía de fluorescencia a partir de la tinción de los EPS con TS. Las imágenes de fluorescencia se superpusieron con imágenes de contraste de fases para mostrar mejor la ubicación de los EPS en los biofilms. Es importante mencionar que la visualización de la acumulación de óxidos de Mn en las macrocolonias se perdió completamente mediante la microscopía por contraste de fases. Sin embargo, ésta es una metodología muy eficiente empleada habitualmente para la observación de las células dentro del biofilm (Serra y Hengge, 2017). De manera que en las imágenes que se muestran a continuación se dejó de lado la

oxidación y se priorizó el análisis de la arquitectura de las células y de los EPS producidos dentro del biofilm.

Como se puede observar en la Figura 4.10., en las dos condiciones ensayadas, con y sin Mn(II), los biofilms de macrocolonias mostraron emisión de fluorescencia, indicativo de la producción de EPS. La franja de células productoras de EPS (Fluorescentes, señaladas con un recuadro de color azul en la Figura) estuvo principalmente en la parte superior de las macrocolonias, en contacto con el oxígeno y, esta franja, quedó subdividida en dos, a partir de una franja de células que no produce EPS en el medio, que marca esta subdivisión, (no emite Fluorescencia, señaladas con un recuadro rojo en la Figura). Se observaron algunas diferencias notables entre las secciones provenientes de macrocolonias crecidas en presencia y en ausencia de Mn(II), tales como una mayor intensidad de fluorescencia y un mayor espesor de las mismas en presencia de Mn(II). Se observó que a partir de la franja de células no productoras de EPS (línea oscura, señalada con un recuadro rojo) el espesor de la macrocolonia crecida en presencia de Mn(II) es mayor que el de la macrocolonia proveniente del medio sin Mn(II) (Figura 4.10.).

Finalmente, en la capa inferior de las macrocolonias, es decir, cerca de la interfaz del agar, la producción de EPS estuvo completamente ausente (área inferior de la macrocolonia, señalada con un recuadro amarillo) (Figura 4.10.).



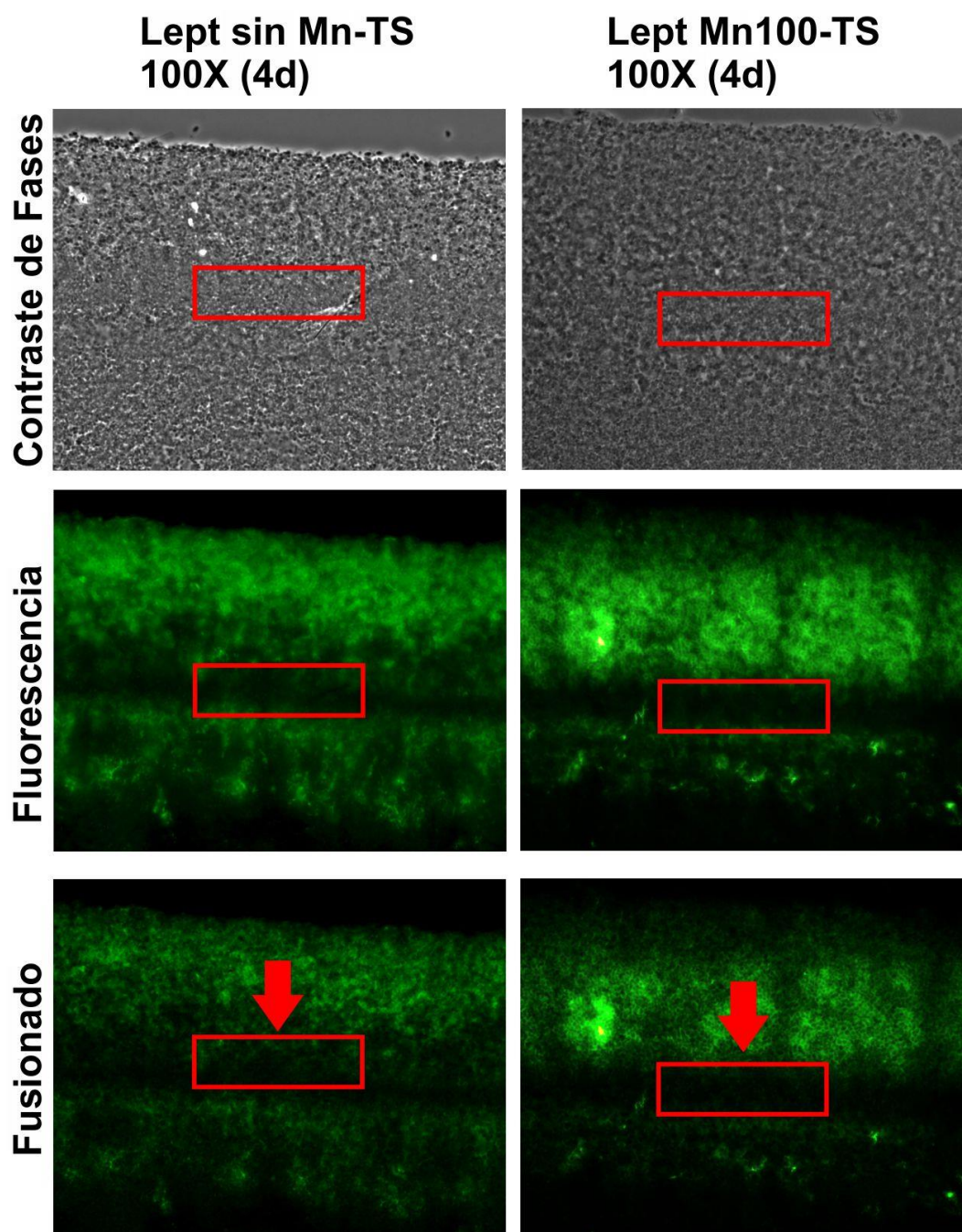


**Figura 4.10. Distribución espacial de EPS en macrocolonias de MOB-181 visualizadas por la fluorescencia de TS.**

Los biofilms de macrocolonias de MOB-181 de 4 d cultivados en medio Lept en ausencia de Mn(II) (Lept sin Mn) o suplementado con Mn 100  $\mu$ M (LeptMn100) en presencia de TS se crioseccionaron perpendicularmente al plano de la macrocolonia con un espesor de 5  $\mu$ m. Las microsecciones se visualizaron por microscopía de fluorescencia. Se muestran las imágenes de contraste de fase (paneles superiores), fluorescencia (paneles de medio) y la superposición de ambas imágenes (paneles inferiores) a un aumento 20X de secciones representativas de macrocolonias de MOB-181 crecidos sin Mn (izquierda) y con Mn (derecha). Las imágenes visualizan la sección vertical completa de las macrocolonias en la región central. Se señala con un cuadro azul la zona productora de EPS en ambas condiciones; con un recuadro rojo la franja de células no productora de EPS que divide en dos franjas a las células productoras; y, con un recuadro amarillo, la zona de la macrocolonia en contacto con el agar que tampoco produce EPS.

En las dos condiciones ensayadas (con y sin Mn), tomando las fotos con un aumento mayor se observó que la fluorescencia de TS mostró un patrón similar a una red o a un "panal" (Figuras 4.11.). Es decir, la magnificación en la imagen mostró siluetas bien definidas de bacterias, donde se puede apreciar que los EPS rodean e interconectan las células. Por otro lado, tal como se había mencionado anteriormente, se observó una capa interna estrecha de células no fluorescentes (Figuras 4.11.), indicando que las bacterias en esta capa interior

no están produciendo EPS. Estas células podrían estar separando dos poblaciones de células diferentes dentro del biofilm.

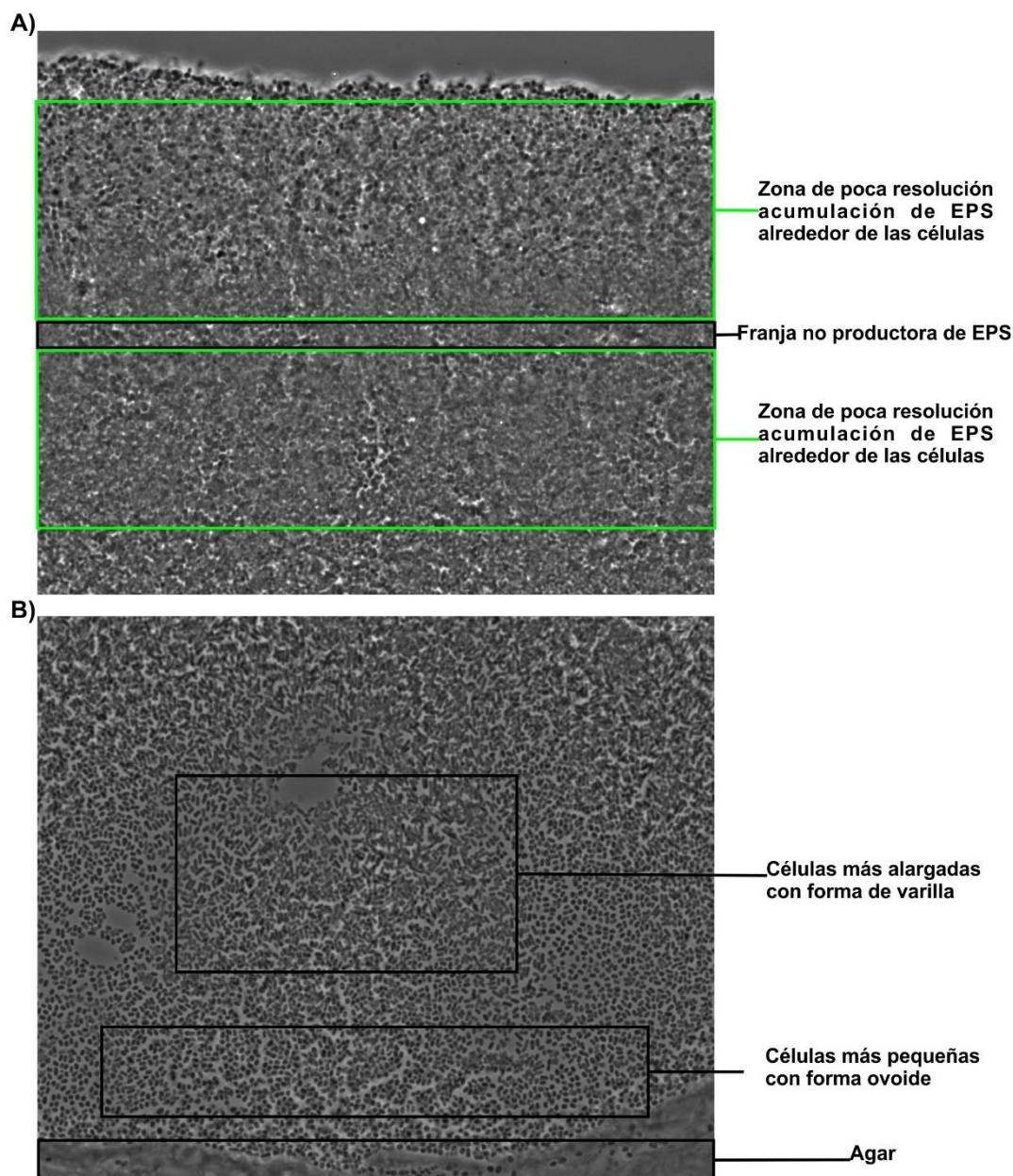


**Figura 4.11. Distribución espacial de EPS en macrocolonias de MOB-181 visualizadas por la fluorescencia de tioflavina S con mayor magnificación.** Se muestran las Imágenes de contraste de fases (paneles superiores), fluorescencia (paneles de medio) y la superposición de ambas imágenes (paneles inferiores) de biofilms crecidos tal como se describió en la Figura 4.10. con las fotos tomadas con una magnificación 1000X de secciones representativas de macrocolonias de MOB-181 crecidos sin Mn (izquierda) y en presencia de Mn(II) (derecha). Las imágenes visualizan la sección vertical de la parte superior de las macrocolonias en la región central.



En la Figura 4.12. se muestra micrografías de contraste de fase de las macrocolonias crecidas sin Mn(II), con una magnificación de 1000X. Se puede notar el grado de resolución con el que pueden llegar a distinguirse células individuales dentro del biofilm. Se dividió a la macrocolonia en dos imágenes con esta magnificación y se muestran las fotografías obtenidas de la capa superior de células del biofilm y de la capa inferior, en contacto con el agar. En la zona de producción de EPS, las imágenes obtenidas por contraste de fases son mucho más difusas, características de la presencia de matriz rodeando a las células. Asimismo, se reconoció como principal morfología de las células presentes en esta zona el tamaño pequeño y la forma ovoide (Figura 4.12). Se señala además con un recuadro negro la zona correspondiente a la franja de células que divide las dos zonas productoras de EPS (Figura 4.12. panel superior). Por otro lado, se puede notar en la Figura 4.12. la mayor separación entre las células que se ubican en la zona inferior de la macrocolonia, en contacto con el agar, la cual fue incapaz de producir EPS (panel inferior). Una observación llamativa respecto de esta zona, es que se pueden evidenciar capas de células con forma de bacilos pero de mayor tamaño que las que se encuentran en la zona productora de EPS. Estas células están señaladas con un recuadro en la Figura 4.12. (panel inferior).

Se muestran solamente las imágenes obtenidas para la macrocolonia crecida en ausencia de Mn(II) dado que la disposición de las células en el biofilm fue muy similar tanto en presencia como en ausencia de Mn(II). Como se mencionó anteriormente, la principal diferencia estuvo dada por la intensidad de la fluorescencia y el mayor espesor de la colonia en presencia de Mn.



**Figura 4.12. Distribución espacial de EPS en macrocolonias de MOB-181 crecida en ausencia de Mn(II).**

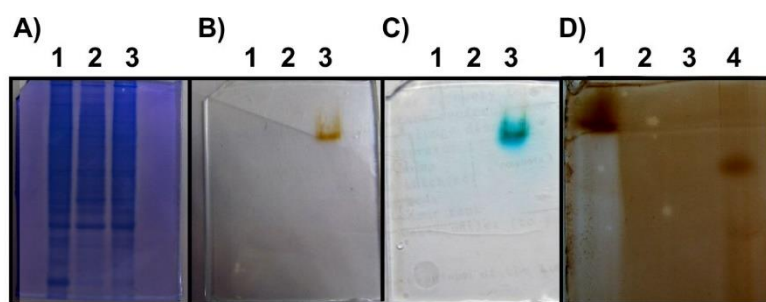
Los biofilms de macrocolonias de MOB-181 de 4 d cultivados en medio Lept (sin Mn (II)) se crioseccionaron perpendicularmente al plano de la macrocolonia con un espesor de 5  $\mu\text{m}$ . Las microsecciones se visualizaron por microscopía de contraste de fases con una magnificación 1000X. Se muestran secciones representativas de la macrocolonia donde se distinguen (A) la zona superior en contacto con el oxígeno y (B) la zona inferior de la macrocolonia, en contacto con el agar. En A) se señalan con recuadros verdes la zona del biofilm de mayor difusión, donde se encuentran las células productoras de EPS y con un recuadro negro la zona no productora de EPS. En B) están señaladas con recuadros las células más pequeñas de forma ovoide, las células de mayor tamaño con forma de varilla y el agar.

### 4.3.3 Detección de Actividad Oxidante de Mn(II) en MOB-181

En esta última parte del capítulo se evaluó la actividad oxidante de Mn(II) en MOB-181 a fin de caracterizar la localización subcelular de la/s enzima/s responsables de la oxidación en MOB-181 crecida en forma de biofilm y también para conocer la identidad de las mismas.

En primer lugar, se puso a punto un ensayo de actividad oxidante de Mn(II) en geles nativos. Se incluyó a la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* como cepa salvaje; una cepa que sobreexpresa la enzima CueO en presencia del inductor IPTG, DH5 $\alpha$ -pUH-*cueO*; y la cepa DH5 $\alpha$ -pUH-*cueO*::Kn ( $\Delta$ CueO) como control negativo. Se detectó una banda positiva de actividad oxidante de Mn(II) en la calle correspondiente a la fracción soluble de proteínas provenientes de la cepa DH5 $\alpha$ -pUH-*cueO*, Figura 4.13. La misma fue utilizada como control positivo de los ensayos siguientes.

Para revelar actividad oxidante de Mn(II) proveniente de extractos de MOB-181, crecidos en biofilms, se empleó la misma metodología y se pudo detectar una banda de oxidación de Mn(II) en la fracción de proteínas secretadas (Fracción 1, descrita en Materiales y Métodos, **Sección 4.2.4.3**), Figura 4.13.



**Figura 4.13. Ensayo de oxidación de Mn “in gel”.** PAGE nativo de proteínas. En los geles A, B y C se muestran los geles que se realizaron para la puesta a punto del ensayo de actividad. En las calles 1, 2 y 3 de estos geles están sembrados los extractos de proteínas solubles de las cepas DH5 $\alpha$  $\Delta$ cueO, DH5 $\alpha$  y DH5 $\alpha$ -cueO, respectivamente. El gel A) fue teñido con Coomassie Blue, el gel B) fue revelado por ensayo de actividad de oxidación de Mn(II) *in gel* y en C) se muestra el mismo gel B) teñido con LBB luego del ensayo de actividad. En el gel D) se muestra el ensayo de actividad para las distintas fracciones celulares de MOB-181. En la calle 1 se sembró como control positivo el extracto soluble de proteínas de DH5 $\alpha$ -cueO, en las calles 2, 3 y 4 se sembró el extracto soluble, restos celulares y proteínas secretadas de MOB-181, respectivamente. Se puede ver actividad oxidante de Mn(II) en la fracción de proteínas secretadas.

Finalmente, se cortó la banda del gel teñido con Coomassie coloidal (no mostrado), correspondiente a la banda responsable de la actividad oxidante de Mn(II) de MOB-181 y se mandó a analizar al Servicio de Identificación de Proteínas por MS y MS-MS de organismos con genomas secuenciados del CEQUIBIEM. La secuencia peptídica SDGTDEAPWTVK hallada en la banda del gel permitió la identificación de la siguiente MCO (Tabla 4.1.), que podría ser la responsable de la actividad oxidante de Mn(II) en MOB-181.

**Tabla 4.1. Descripción de la proteína identificada con la secuencia peptídica SDGTDEAPWTVK**

Acceso	Descripción
J2YFM1	Putativa multicobre oxidasa OS= <i>Pseudomonas</i> sp. GM78 GN=PMI35_00197 PE=4 SV=1 - [J2YFM1_9PSED]

#### 4.4 Discusión

En esta sección se llevó a cabo una investigación microscópica a partir del modelo de biofilms de macrocolonia de la cepa MOB-181, donde se realizaron ensayos de observación fenotípica de macrocolonias, en presencia y ausencia de Mn(II), y posterior crio-seccionamiento/microscopía, para tratar de inspeccionar en detalle la arquitectura de los biofilms, la distribución de la oxidación de Mn(II) dentro de los mismos y el arreglo tridimensional de los EPS.

A diferencia de los cultivos planctónicos convencionales, los biofilms de macrocolonias son heterogéneos con respecto al estado fisiológico de las células que albergan (Stewart y Franklin, 2008). Las diferencias observadas en las células del interior de las macrocolonias se explica por el hecho de residir en diferentes lugares dentro de comunidades estructuralmente complejas implicando que las bacterias no están expuestas de manera uniforme a los recursos de crecimiento y las moléculas de señalización extracelular que se difunden a lo largo de los gradientes. Tales gradientes químicos tienen un impacto en la expresión génica, lo que en última instancia determina la formación de subpoblaciones fisiológicamente distintas (Stewart y Franklin, 2008). Así por ejemplo, los nutrientes clave y los aceptores de electrones pueden agotarse localmente dentro de un grupo de células del biofilm. Asimismo, las células

ocupan un espectro de estados, desde aquellas células que crecen rápidamente hasta que aquellas no crecen en absoluto.

- *Oxidación de Mn(II) en Biofilms*

En el primer capítulo se demostró que el inicio de la oxidación de Mn(II) por MOB-181 en medio Lept sólido ocurre dentro de las primeras 24 h de crecimiento a 28 °C, y este momento, tal como en otras bacterias (Geszvain *et al.*, 2011), coincide con el inicio de la fase estacionaria (Figura 3.9.). Las imágenes microscópicas por campo claro obtenidas de las criosecciones de las macrocolonias crecidas en presencia y en ausencia de Mn(II) resultaron exitosas para poder apreciar diferencias entre los biofilms en las dos condiciones. En particular, se pudo confirmar que los óxidos de Mn se precipitan y retienen dentro del biofilm y resultó de gran interés el reconocimiento de las zonas del biofilm capaces de llevar a cabo la oxidación del metal. En el caso de MOB-181, la distribución de la oxidación de Mn(II) dentro de la macrocolonia resultó bastante homogénea, aunque se destacan algunas áreas donde la oxidación es mayor. Por otro lado, el fenotipo de la macrocolonia de MOB-513, mostró una única zona de la colonia donde se puede ver oxidación de Mn(II), correspondiente con una fracción de células localizada en la parte superior de la macrocolonia. En el tercer capítulo se determinó que MOB-181 tiene una capacidad superior de oxidación de Mn(II) que MOB-513 (Figura 3.7.) y esto puede estar atribuido a los fenotipos de oxidación observados en las macrocolonias en esta parte del trabajo. De esta manera, se pretende destacar la importancia de los estudios de crioseccionamiento/microscopía para tratar de comprender los fenómenos en el interior de un biofilm bacteriano.

Los nutrientes y los gradientes de oxígeno son particularmente cruciales en la diferenciación fisiológica. Estos gradientes se producen en cualquier biofilm y resultan del equilibrio dinámico entre la difusión y el consumo (Serra y Hengge, 2014). En *P. aeruginosa*, se ha visto que el oxígeno es fundamental para mantener activo el metabolismo celular en ausencia de aceptores de electrones alternativos. En regiones cercanas a la superficie de las macrocolonias de *P. aeruginosa*, el oxígeno se consume más rápido de lo que puede difundir en capas más profundas, por lo que se vuelve inaccesible para el resto de la comunidad (Werner *et al.*, 2004). Por lo tanto, al actuar como un recurso que

limita el crecimiento, el oxígeno define un patrón de dos capas con una capa superior de células (de aproximadamente 60  $\mu\text{m}$  de espesor) que exhibe una síntesis de proteínas activa y una capa gruesa de células media y baja (aproximadamente dos tercios de la macrocolonia) que son metabólicamente inactivas (Werner *et al.*, 2004; Williamson *et al.*, 2012). Debido a esta inactividad, las células en la capa inferior permiten que los nutrientes se difundan desde la interfaz de agar a través de la capa inferior de la colonia hasta la capa superior donde realmente se consumen. Esta observación es particularmente importante en el caso de un biofilm de una bacteria oxidante de Mn(II), dado que el oxígeno es fundamental para que la oxidación sea mediada biológicamente (Gislette y Mouchet, 1997; Mouchet, 1992). Si bien en estos ensayos no se midió el gradiente de  $\text{O}_2$  presente a lo largo de la macrocolonia, se puede especular que está jugando un rol fundamental en la oxidación del Mn(II). Esta puede ser la razón que explique por qué una gran proporción de células de la macrocolonia de MOB-513 es incapaz de llevar adelante la oxidación (Figura 4.7.). El gran espesor de la misma ( $\sim 400\mu\text{m}$ ), aproximadamente el doble del de MOB-181 ( $\sim 200\mu\text{m}$ ), puede estar ocasionando una capa gruesa de células media y baja desprovista de  $\text{O}_2$  y haciendo limitante este recurso para la población de células que se encuentra en contacto con la superficie del agar.

#### - Producción de EPS

En la segunda parte de este capítulo se pudo detectar la producción de EPS en MOB-181, luego del cuarto día de crecimiento en las condiciones ensayadas. Se observó una reacción positiva tanto en presencia como en ausencia de Mn(II), con cada uno de los colorantes ensayados (RC, CF y TS), indicando que la producción de EPS en MOB-181 es independiente de la presencia de Mn(II) en el medio. Por otro lado, si bien estos ensayos no fueron cuantitativos, cualitativamente se observó un aumento notable en la producción de EPS en la condición de crecimiento en presencia de Mn en el medio. Esto estuvo denotado por el fenotipo más rugoso en presencia de RC (Figura 4.8.) y una mayor intensidad de fluorescencia en presencia de TS (Figuras 4.10. y 4.11.).

El RC es un colorante que se une a la mayoría de los EPS (Romling *et al.*, 1998), mientras que CF es un colorante más específico para la celulosa (Spiers

*et al.*, 2002). Por otro lado, la fluorescencia de la TS es específica para proteínas y celulosa (Serra *et al.*, 2013b). A la luz de estos resultados es posible especular que uno de los EPS producidos por MOB-181 es la celulosa. Asimismo, esta bacteria no mostró un fenotipo viscoso típico de las cepas productoras de EPS capsulares, tales como el alginato sugiriendo que esta cepa no produce este EPS capsular. Sin embargo, es importante tener en cuenta que controles apropiados, tales como cepas mutantes que carecen de componentes particulares de la matriz, deben incluirse en el ensayo para atribuir un elemento de matriz particular.

Gracias al enfoque de crioseccionamiento/microscopía se pudo observar diferentes capas de células dentro del biofilm de MOB-181 capaces e incapaces de producir EPS (Figura 4.10. y 4.11.). Por otro lado, se pudo apreciar que la oxidación de Mn(II) no está estrictamente asociada con la producción de EPS. Esto se vio reflejado por el hecho que de la oxidación no estuvo atribuida únicamente a las células productoras de EPS, sino prácticamente a toda la macrocolonia en el caso de MOB-181.

#### - *Relaciones entre Formación de Biofilms y Oxidación de Mn(II) en MOB-181*

En general, la oxidación de Mn(II) ocurre en células sedentarias de fase estacionaria y da como resultado que las células estén incrustadas en óxidos sólidos que se predice que impiden la motilidad (Geszvain *et al.*, 2011). Esto sugiere que las bacterias primero pueden unirse entre sí o a una superficie y formar una comunidad de biofilms sésiles antes de que comience la oxidación (Geszvain y Tebo, 2010). En *P. putida* GB-1, la oxidación de Mn(II) comienza en la fase estacionaria en la superficie externa de la célula, formando una capa de óxidos de Mn (III,IV) insolubles (Geszvain *et al.*, 2011).

Durante la transición a la fase estacionaria, las células bacterianas exhiben una forma esférica más pequeña para su supervivencia en un entorno de inanición (Hengge-Aronis, 1993; Kaprelyants y Kell, 1996). Las células de *P. aeruginosa*, como las de otras especies bacterianas, son ovales o esféricas en la fase estacionaria en contraste con la morfología en forma de varilla de las células en crecimiento (Lange y Hengge-Aronis, 1991). En los experimentos de criosección/microscopía, se pudo observar cómo las células productoras de EPS

dentro del biofilm mostraron un fenotipo morfológico ovalado o esférico más pequeño, examinado bajo microscopía de fluorescencia y de contraste de fases, un hallazgo indicativo de que las células están en fase estacionaria, es decir, en una condición en la que se producen los componentes de la matriz extracelular (Serra *et al.*, 2013b). Esto se condice con los ensayos de recuentos de bacteria que indican que en este tiempo (4 d) las células se encuentran en fase estacionaria (Figura 3.9.). Sin embargo, es interesante destacar, que en los biofilms de MOB-181 también se observaron capas de células morfológicamente diferentes, con forma de bastón y de mayor tamaño. Las mismas son características de células en fase post-exponencial, en la que los recursos ya no son óptimos, pero aún no están completamente agotados. En el caso de las células de *E. coli* se sabe que estas células producen flagelos y se vuelven altamente móviles (Adler y Templeton, 1967), lo cual permite suponer que hay células que estarían mostrando crecimiento activo dentro del biofilm de MOB-181. En los biofilms crecidos en tanto presencia como en ausencia de Mn(II) estas células en crecimiento dentro del biofilm coinciden con las zonas donde no se observa emisión de la fluorescencia que está en contacto con el agar, es decir, no pertenecen al grupo de células productoras de EPS dentro de la macrocolonia.

Como se mencionó anteriormente, en presencia de Mn(II) parece haber una mayor producción de EPS, lo cual podría ser responsable de una mayor producción de biofilms en presencia de Mn(II) tal como se observó en la cuantificación con CV de los biofilms de MOB-181 crecidos en presencia de Mn(II) con respecto a biofilms crecidos sin Mn(II) (Figura 3.8.).

En cuanto a la oxidación de Mn(II), se pudo determinar que la actividad oxidante de Mn(II) en MOB-181 se encuentra en la fracción de proteínas secretadas, lo cual coincide con muchas MOB reportadas hasta el momento. Específicamente se encontró una putativa MCO que podría ser la responsable de la actividad en el exterior celular. Integrando los resultados de producción de EPS y de oxidación de Mn(II) obtenidos en este trabajo, donde se determinó que el inicio de la oxidación de Mn(II) ocurre dentro de las primeras 24 h, que la proteína responsable de la oxidación es secretada al exterior de las células y que la detección de la producción de EPS fue visible recién luego del cuarto día de crecimiento, se puede deducir que la oxidasa de Mn(II) es secretada antes de la



acumulación excesiva de EPS en el exterior celular. Por consiguiente, la producción de MCO no estaría relacionada con la de EPS en esta bacteria, resultados que se confirmarán a futuro cuando se obtenga la secuencia del ADN genómico de MOB-181, que permitirá realizar mutantes en genes relacionados a la producción de EPS y en la MCO detectada.

En un estudio realizado con la cepa MnB1 de *P. putida* en medio Lept se mostró que el inicio de la oxidación de Mn(II) ocurrió a  $t > 24$  h, cuando el cultivo se encontraba en la fase estacionaria temprana. A  $36 > t < 48$  h, la oxidación fue notablemente visible e, inconsistentemente con lo que se observó para MOB-181, las células de *P. putida* se agregaban y producían EPS durante a  $20 > t < 25$  h, simultáneo al tiempo de la oxidación de Mn(II). Asimismo, en este estudio se tomaron imágenes mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) de *P. putida*, cultivada en Lept agar (Toner *et al.*, 2005). Si bien, los resultados de las imágenes obtenidas por TEM sugieren que el precipitado de Mn estaba estrechamente asociado con las células, no se pudo localizar *in situ* dentro del biofilm dado que no se empleó el modelo de las macrocolonias.

Finalmente, hay una serie de indicios que revelan que los mecanismos de formación de biofilms y de oxidación de Mn(II) en MOB podrían estar vinculados desde el punto de vista de la regulación. En un trabajo publicado en 2011, se realizó una selección aleatoria de mutagénesis por transposición donde se aislaron 12 cepas mutantes de *P. putida* GB-1 que mostraron una oxidación acelerada de Mn(II) en medios sólidos en relación con la cepa salvaje (Geszvain *et al.*, 2011). En 8 de las 12 cepas, el transposón estaba inserto en algún gen formando parte del regulón flagelar de *P. putida* GB-1. Si bien no se pudieron determinar las bases moleculares por las cuales los mutantes de flagelos afectaban la oxidación, se especuló que una combinación de efectos sobre la transcripción del gen de la oxidasa de Mn(II) y de los de formación de biofilm puede ser responsable del efecto complejo de los mutantes flagelares sobre la oxidación de Mn(II) (Geszvain *et al.*, 2011).

En este trabajo se demostró que el enfoque de criosección/microscopía puede ser muy útil para esto. El empleo de estas nuevas técnicas permite tomar dimensión de lo que ocurre en el interior de los modelos de biofilms y rompe con el obstáculo que presentan las técnicas convencionales que devuelven un “promedio” del comportamiento de un conjunto de células, que conlleva a tomar

conclusiones erróneas de lo que realmente ocurre en una comunidad microbiana real compleja.

A futuro se propone utilizar este tipo de técnicas directamente para examinar visualmente la expresión de genes controlados espacialmente en biofilms de macrocolonias utilizando cepas que expresan fusiones de genes reporteros, tales como la proteína verde fluorescente (GFP) a regiones promotoras de putativas oxidasas de Mn(II). Esto nos permitiría localizar *in situ* la actividad oxidante de Mn(II) dentro de un biofilm. Asimismo, dado que la regulación de la formación de biofilms está muy bien caracterizada en el género *Pseudomonas*, se propone estudiar el efecto de mutantes en el sistema regulatorio de biofilms para evaluar su impacto en la oxidación de Mn(II).

## **5 Inoculación a Escala de Laboratorio con el Aislado MOB-181 para Probar su Funcionalidad en la Remoción de Mn Presente en Aguas**

### **5.1 Introducción**

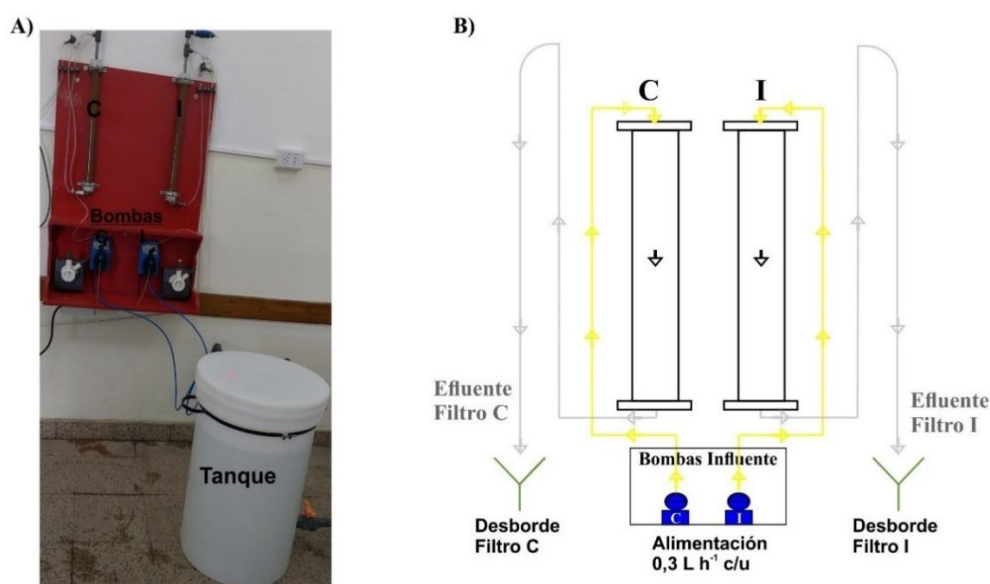
En los capítulos anteriores, se determinó que *Pseudomonas* MOB-181 fue el aislado que presentó las características deseables para la optimización del proceso de remoción de Mn(II) de aguas, y se caracterizó la relación entre los mecanismos de formación de biofilms y de oxidación de Mn(II) de este aislado. Se postula que es un prometedor candidato para estudios de bioaumentación, esperando una rápida adaptación, evolución y actividad en el sistema de filtros.

El objetivo general de este capítulo fue determinar el efecto de una estrategia de bioaumentación con MOB-181 en la remoción de Mn(II) presente en aguas subterráneas naturales. Se llevó a cabo un ensayo a escala de laboratorio utilizando un sistema de filtros diseñado por nuestro grupo de trabajo. Se tuvo en cuenta que todos los inoculantes bacterianos son sensibles a la temperatura y que la variación de este parámetro es inevitable en la aplicación real del tratamiento, de modo que se decidió realizar dos ensayos en periodos diferentes, cuya principal diferencia fue el registro de temperaturas de los mismos. De esta manera, se estudiaron en paralelo dos filtros a escala de laboratorio para la eliminación de Mn(II) de las aguas subterráneas, un filtro inoculado con MOB-181, y un filtro control sin inocular. Para evaluar la capacidad de remoción de Mn(II) del sistema, se cuantificó la concentración de Mn(II) en el agua influente y efluente de ambos filtros. Además, se utilizó la secuenciación por Illumina del gen 16S ARNr para examinar la diversidad microbiana en los filtros y la sobrevivencia de MOB-181 al finalizar el tratamiento.

## 5.2 Materiales y Métodos

### 5.2.1 Construcción de un Sistema de Filtros a Escala de Laboratorio

En colaboración del CIS se construyó un sistema simple de filtrado que permitió realizar pruebas de la funcionalidad de un inóculo bacteriano en ensayos de remoción de Mn(II) a escala de laboratorio (Figura 5.1.). El sistema consistió en dos biofiltros idénticos contruidos con columnas de vidrio de 50 cm de alto con un diámetro interior de 2,5 cm, rellenas con arena (tamaño de partícula de 0,9 - 1,0 mm). Se utilizó un biofiltro como control negativo (la cual no se lo inoculó con bacterias), mientras que el otro se inoculó con MOB-181 para evaluar el efecto de la bioaumentación en la eliminación de Mn(II) del agua cruda.



**Figura 5.1. Esquema de los biofiltros utilizados en el ensayo de remoción de Mn(II) a escala laboratorio.** En A) se muestra una fotografía del sistema real usado en este trabajo. B) Esquema del sistema diseñado que incluyó un tanque de almacenamiento del agua cruda a tratar, dos bombas a diafragma (azules) para bombear el influente hacia cada filtro. Se utilizaron dos columnas, una rellena de material filtrante sin inocular (C) y la otra inoculada con MOB-181 (I). Se dispuso de 2 puertos de muestreo (Desborde Filtro C y Desborde Filtro I) para medir las concentraciones de Mn(II) en las muestras acuosas de los efluentes de ambas columnas.

Se decidió trabajar con un agua cruda, extraída de una excavación subterránea (Pozo 44) de la localidad de San Lorenzo (SL), Santa Fe (32° 45' 10,1" Sur - 60° 45' 17,2" Oeste). Los datos de calidad del agua cruda (Tabla 5.1.) se cuantificaron en el CIS-UNR, utilizando métodos estándar (Rice *et al.*, 2017).

Se utilizó un tanque de 80 L como reservorio del agua a tratar, y se bombeó esta agua continuamente a las columnas mediante dos bombas a diafragma (caudal de cada una:  $0,3 \text{ L h}^{-1}$ ) que irrigaban ambas columnas en paralelo. Las muestras de agua subterránea se recolectaron semanalmente de la localidad de San Lorenzo.

### **5.2.2 Caracterización Microbiológica del Agua Cruda de SL**

La toma de muestras para la determinación de la presencia/ausencia de MOB en el agua cruda de SL, se realizó *in situ* mediante la técnica de celda de flujo descrita por (Gariboglio y Smith, 1993). Dicho dispositivo está compuesto por un recipiente cilíndrico que contiene un soporte para 8 portaobjetos de vidrio de microscopio y por donde fluye el agua a estudiar. El tiempo de exposición necesario para la recolección de los microorganismos varía entre 7 a 20 d, dependiendo de las concentraciones de Fe y Mn. En el caso particular de SL, se instaló una celda de flujo por 20 d en la canilla de muestreo del pozo 44, mediante una conexión que alimentaba a la celda por su parte inferior. Dado que las bacterias presentes en el agua se adhieren a los portaobjetos formando biofilms, para identificar las MOB se realizaron plaques de los biofilms recuperados en el medio selectivo PC, tal como se indica en el Primer Capítulo (Materiales y Métodos, Sección 3.2.3).

### **5.2.3 Determinación de la Concentración de Biomasa Requerida para Inocular la Arena de los Filtros al Inicio del Ensayo de Remoción de Mn(II)**

Para determinar la relación de inóculo/material filtrante adecuada para la inoculación de MOB-181 en los ensayos de bioaumentación, se realizaron dos ensayos de adsorción de células de MOB-181 en arena estéril de tamaño efectivo de 0,9 - 1,0 mm (similar a la utilizada en los sistemas de filtración biológica de aguas subterráneas). En ambos ensayos, se partió de diferentes concentraciones iniciales de células y de una cantidad de arena constante (20 g). MOB-181 fue crecida en agitación hasta fase exponencial tardía ( $OD_{600nm}=2,5$ ) y diferentes cantidades de células fueron resuspendidas en un volumen de 10 mL de medio LB, suplementado con  $MnCl_2$   $100 \mu M$ , e incubados estáticamente en frascos de 100 mL en presencia de 20 g de arena estéril a 28

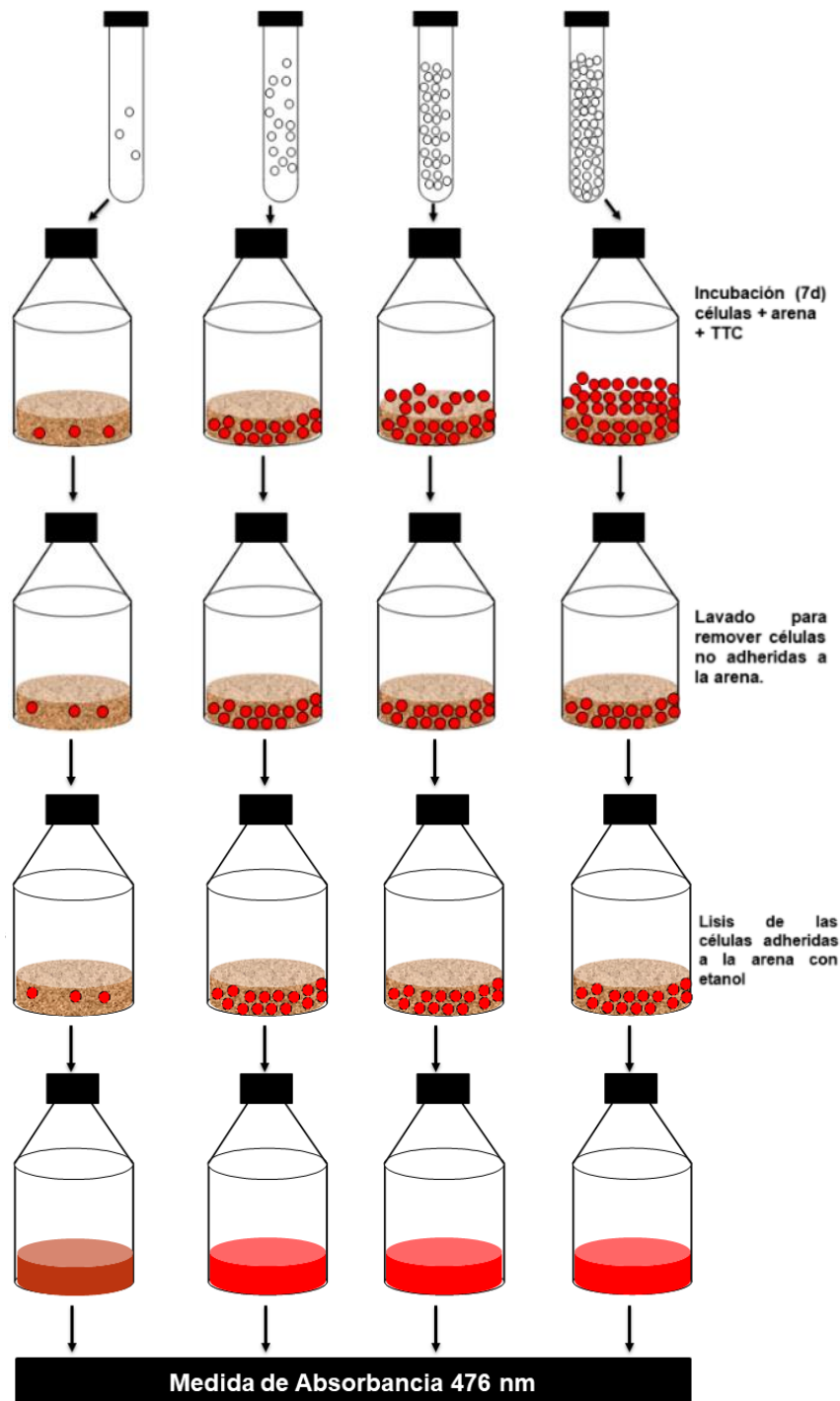
°C durante 7 d. Como parámetro de referencia de la cantidad de bacterias que se utilizaron, se cuantificó el peso seco de la biomasa bacteriana inicial. Para ello, 10 mL de los cultivos crecidos en medio LB se filtraron con papel de filtro previamente pesado. Luego, el papel de filtro fue secado a 80 °C hasta obtener un peso constante y el peso seco de la masa bacteriana se calculó por diferencia. Se realizaron cuatro repeticiones por cada análisis y como control negativo se usaron frascos con arena sin células.

#### **5.2.3.1 Ensayos de Producción de Formazán de Células de MOB-181 Crecidas en Presencia de la Sal de Tetrazolio TTC**

En primer lugar, se puso a punto un ensayo de adsorción a la arena en presencia de la sal de tetrazolio, TTC (cloruro de 2, 3, 5-trifenil tetrazolio), un compuesto que en presencia de bacterias metabólicamente activas puede ser utilizado como una herramienta analítica para cuantificar la viabilidad celular mediante métodos colorimétricos, dado que puede ser reducido por las deshidrogenasas bacterianas a 1,3,5-trifenilformazán, de color rojo (Perez *et al.*, 2010). De este modo, se deriva que la cantidad de formazán generado es proporcional a la biomasa bacteriana (Berridge *et al.*, 2005). El indicador redox, cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (TTC), fue provisto por Merck (Darmstadt, Alemania).

Como se mencionó, frascos de 100 mL con 20 g de arena estéril fueron incubados con 10 mL de medio LB con distintas cantidades de células iniciales de MOB-181; 0,5 mg mL<sup>-1</sup> de TTC y 100 µM de MnCl<sub>2</sub>. Como control negativo se usaron frascos sin células. Se incubaron estáticamente los frascos a 28 °C durante 7 d. Al cabo de este tiempo, se lavó la arena con abundante agua estéril mediante sucesivos lavados, para remover las células planctónicas no adheridas. Luego, para determinar la acumulación intracelular del colorante en las células adheridas a la arena, se procedió a efectuar la lisis de las células bacterianas con 10 mL de etanol (grado farmacéutico). Finalmente, se realizó una centrifugación (5 min, 5000 g) con el objetivo de decantar los restos celulares, y se midió la absorbancia del sobrenadante a 476 nm de longitud de onda de absorción empleando un espectrofotómetro UV-visible, Synergy 2 Reader (BioTek). De esta manera, la cuantificación colorimétrica del grado de acumulación intracelular del colorante formazán es proporcional a la cantidad de

bacterias, que a su vez dependerá de la capacidad de los microorganismos para adherirse a la arena. En la Figura 5.2. se muestra un esquema del protocolo utilizado con la sal TTC.



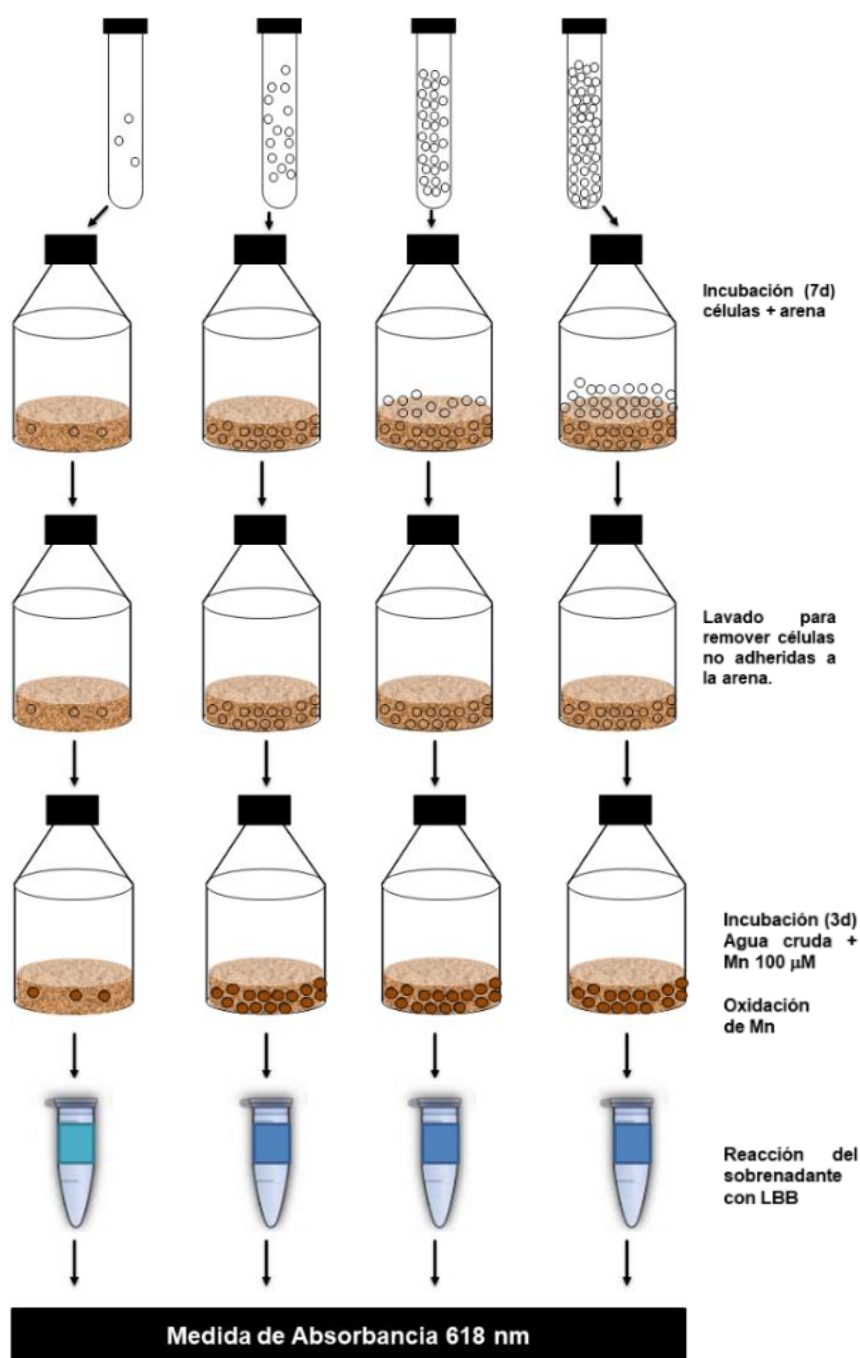
**Figura 5.2. Cuantificación de la concentración de células adheridas sobre la superficie de la arena de los filtros.** Distintas concentraciones iniciales de células de MOB-181 fueron adsorbidas sobre la arena en presencia de TTC y posteriormente se realizaron cuantificaciones de células adsorbidas viables. Se midió la producción de formazán de las células adsorbidas en la arena luego de la lisis de las mismas con etanol y posterior medida de absorbancia (Absorbancia<sub>476nm</sub>).

### **5.2.3.2 Ensayos de Oxidación de Mn(II) de las Células de MOB-181 Adheridas para Determinar la Concentración Óptima de Inóculo**

En segundo lugar, se realizaron ensayos de oxidación de Mn(II) de MOB-181. Para ello, frascos de 100 mL con 20 g de arena estéril fueron incubados con 10 mL de medio-LB con distintas cantidades de células iniciales de MOB-181 y 100  $\mu$ M de MnCl<sub>2</sub>. Como control negativo se usaron frascos sin células. Se incubaron estáticamente los frascos a 28 °C durante 7 d. Al cabo de este tiempo, se realizaron sucesivos lavados de la arena, para remover los microorganismos no adheridos. Posteriormente, se incubaron estas arenas con las bacterias inmovilizadas en su superficie, en presencia de agua cruda de SL (Tabla 5.1.), que naturalmente contiene Mn(II), previamente esterilizada, y se suplementó con MnCl<sub>2</sub> hasta una concentración final de 1 g L<sup>-1</sup>. Se incubó a 37 °C para favorecer la oxidación de Mn(II) presente en el agua cruda y a los 3 d se determinó la concentración de óxidos de Mn(II) mediante el ensayo con LBB. Brevemente, se tomó 1 mL del sobrenadante y se incubó con 0,5 mL de LBB, y se calculó la concentración de óxidos LBB a partir de la curva de calibración con KMnO<sub>4</sub> para determinar la concentración de óxidos de Mn producidos en cada caso.

En este caso, se consideró efectivo utilizar la cantidad de óxidos producidos luego de 3 d (cuantificación de DO<sub>618nm</sub> mediante reacción con LBB) como criterio para determinar cualitativamente la cantidad de células adsorbidas a la superficie: cuanta mayor oxidación de Mn(II), mayor cantidad de células oxidantes inmovilizadas. Es importante aclarar que MOB-181, fue incapaz de oxidar Mn(II) en un medio rico como el LB, de modo que este medio de cultivo fue utilizado únicamente para permitir la inmovilización de la células a la arena. En la Figura 5.3., se muestra un esquema del protocolo utilizado que permitió determinar las relaciones óptimas entre la cantidad de células iniciales/matriz en cada bacteria.





**Figura 5.3. Protocolo utilizado para la determinación de la concentración óptima de inóculo.** Las células fueron inmovilizadas mediante la incubación estática junto con la arena durante 7 d a 28 °C en LB suplementado con Mn 100 µM, para favorecer la activación de genes de resistencia al metal. Las células no adheridas fueron eliminadas por sucesivos lavados y se incubaron las arenas con células inmovilizadas en presencia de H<sub>2</sub>O cruda estéril conteniendo Mn(II) 100 µM. Luego de 3 d de incubación se cuantificó la cantidad de MnOx producidos en cada caso con LBB. Se consideró que la cantidad de MnOx presentes era proporcional a la cantidad células que estuvieran oxidándolos.

### 5.2.4 Ensayo de Remoción de Mn del Agua a Escala Laboratorio

Se utilizó el sistema de purificación de aguas descrito en 5.2.1. para ensayar la remoción de Mn(II) a escala de laboratorio. Se comparó el comportamiento de un biofiltro control negativo (sin inocular bacterias), con el otro biofiltro inoculado con MOB-181, inmovilizada previamente sobre la arena, y estos ensayos se utilizaron para evaluar el efecto de la bioaumentación con MOB-181 en la eliminación de Mn del agua cruda. Se decidió estudiar el efecto de la bioaumentación con MOB-181 en dos períodos del año distintos, que estuvieron principalmente diferenciados por la temperatura de los mismos. Si bien el sistema de filtros se operó en el interior de un laboratorio del CIS, se trabajó a temperatura ambiente. El registro de temperaturas ambiente fue tomado diariamente de la página web: <https://www.accuweather.com/es/ar/rosario/11222/weather-forecast/11222>

#### 5.2.4.1 Métodos Analíticos

##### 5.2.4.1.1 Determinación de la Concentración de Mn(II) de Aguas

Durante los ensayos de remoción de Mn(II), se colectaron muestras de aguas del tanque de entrada (influyente) y de la salida de cada biofiltro (efluentes) para el análisis diario de la concentración de Mn(II). Las muestras de agua se ajustaron a un pH <2 con HCl y a partir de diluciones adecuadas se determinó el Mn(II) total usando el kit de detección de Mn de bajo rango. Método: PAN, Rango de detección: hasta 0,7 mg L<sup>-1</sup>, Tamaño de muestra: 25 mL. Cada determinación se realizó por triplicado. El error del método es de 0,05 mg L<sup>-1</sup>.

Se utilizó la siguiente ecuación para calcular la eficiencia de remoción de Mn(II) del agua subterránea (%) en ambos filtros:

$$\% \text{ Eficiencia de Remoción} = \frac{[\text{Mn}]_{\text{ingreso}} - [\text{Mn}]_{\text{egreso}}}{[\text{Mn}]_{\text{ingreso}}} * 100$$

##### 5.2.4.1.2 Medidas de pH y Oxígeno Disuelto (OD)

Se tomaron las medidas de pH (Método electrométrico: pH-metro portable HACH sensION1), y se midieron las concentraciones de OD (mg L<sup>-1</sup>) (medidor de OD, Hanna HI 9143). Cada determinación se realizó por triplicado.

### **5.2.5 Distribución de la Oxidación de Mn(II) en los Filtros**

Al cabo de un tiempo de operación continua, los biofiltros alcanzaron un estado estacionario estable alcanzando un 100 % de remoción de Mn. En ese punto se finalizaron los ensayos y se registró el aspecto final de los filtros mediante fotografías de los mismos. Posteriormente, se dividió a cada biofiltro en cuatro secciones para analizar la distribución de óxidos de Mn acumulados. Cada fracción se analizó por separado y se hicieron comparaciones entre las mismas. La acumulación de óxidos de Mn a lo largo de los filtros se calculó con el método colorimétrico con LBB. Brevemente, se incubó 1 g de arena con 1 mL de buffer Hepes 10 mM (pH=7,5), y la mezcla se vortexeó vigorosamente para desprender los óxidos unidos. Luego, diluciones de estos sobrenadante se incubaron con LBB. Las concentraciones de óxidos se determinaron con una curva de calibración realizada con  $\text{KMnO}_4$ .

#### **5.2.5.1 Determinación de la Presencia de MOB en los Filtros al Finalizar el Ensayo de Remoción de Mn(II)**

Se unificaron las fracciones de arena y se utilizaron para analizar la presencia de MOB en las columnas control e inoculadas. Para ello, brevemente, se resuspendió 1 g (peso húmedo) de muestra de arena en 1 mL de buffer Hepes 10 mM (pH=7,5), se vortexeó vigorosamente durante 5-10 min para desprender las bacterias de la arena. Estas suspensiones se sembraron en placas de medio selectivo y después de 14 d de incubación a 28 °C, se examinaron las placas a fin de detectar las colonias marrones correspondientes a MOB. Las mismas fueron confirmadas mediante la adición de una gota de LBB por encima de las colonias y posterior reacción de color azul, indicativo de la presencia de óxidos de Mn.

### **5.2.6 Extracción de ADN, Secuenciación y Preparación de la Biblioteca de ARNr 16S**

Luego de unificar las distintas fracciones de arena, se extrajeron muestras de ADN a fin de caracterizar la comunidad bacteriana presente en ambos filtros una vez finalizado el tratamiento. Se realizó el mismo procedimiento descrito previamente en el Capítulo 3 (Materiales y Métodos, **Sección 3.2.2.1 - 3.2.2.3**).

## 5.3 Resultados

Los ensayos de remoción de Mn(II) que se describen en esta sección, se realizaron en colaboración con la Lic. Lucila Ciancio, estudiante de Doctorado en Ciencias Biológicas. Parte de su proyecto de Doctorado está focalizado en el escalado del sistema de remoción de Mn de aguas.

La brecha entre los avances obtenidos en las investigaciones en el laboratorio y la posible aplicación de las bacterias a filtros de escala real para que remuevan Mn(II) es uno de los mayores desafíos a los cuales nos enfrentamos. En cuanto a la posibilidad de aplicar las MOB estudiadas en este trabajo de tesis surgieron las siguientes preguntas: ¿Cuáles bacterias aplicar? ¿En qué concentración y en qué forma se deben aplicar? ¿Será efectiva la introducción de las bacterias elegidas? y ¿Qué pruebas hay de que el empleo de las bacterias obtenidas en este trabajo será mejor que las nativas?

### 5.3.1 Criterios de Selección Bacteriana

Para responder a la primer pregunta, ¿Cuáles bacterias aplicar?, y decidir cuáles aislados bacterianos eran los más adecuados para diseñar un inóculo, se tuvieron en cuenta cuidadosamente los estudios realizados y descriptos en el Capítulo 3. Se consideró que el comportamiento de las bacterias dentro del filtro dependerá de qué tan bien puedan sobrevivir, reproducirse y permanecer activas en este nuevo entorno sujeto regularmente a distintos cambios. Por lo tanto, no sólo se tuvo en cuenta la capacidad de formación de biofilms y de oxidación de Mn(II) sino que, además, se consideraron las capacidades de oxidar este metal en distintas condiciones de crecimiento. Es por esto que se decidió realizar un ensayo de inoculación con *Pseudomonas* sp. MOB-181 ya que fue la cepa que mostró el mejor comportamiento y actividad en todas las condiciones ensayadas en el laboratorio (Tabla 3.9.). Este aislado pudo oxidar Mn(II) en un amplio rango de temperaturas y de concentración de este metal (Figura 3.9. y Figura 3.10.A); la presencia de altas concentraciones de inhibidores como Fe(II) no afectaron considerablemente su capacidad de oxidación de Mn(II) (Figura 3.10.B); y fue

capaz de oxidar Mn(II) en diferentes medios que variaban la composición y en aguas subterráneas (Figura 3.12).

### 5.3.2 Sistema de Filtrado a Escala de Laboratorio.

Para evaluar el efecto de la bioaumentación con MOB-181 en la remoción de Mn(II) de aguas, se utilizó el sistema de filtros descrito en Materiales y Métodos (Figura 5.1.), donde una de las dos columnas funcionó como el control de los experimentos y la otra se inoculó con MOB-181. Un tanque de 80 L sirvió como reservorio del agua cruda natural, extraída de una excavación subterránea (Pozo 44) de la localidad de San Lorenzo, Santa Fe. Se determinó que el agua proveniente de tal excavación contenía una concentración inicial de Mn(II) igual a  $0,14 \text{ mg L}^{-1}$  (Tabla 5.1.) y se suplementó con Mn(II) para llegar a una concentración final de  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , que es la concentración máxima de Mn(II) que se puede encontrar en otras excavaciones subterráneas de la provincia de Santa Fe, como ejemplo, en la localidad de Las Garzas donde la concentración de Mn(II) es de  $1,05 \text{ mg L}^{-1}$ .

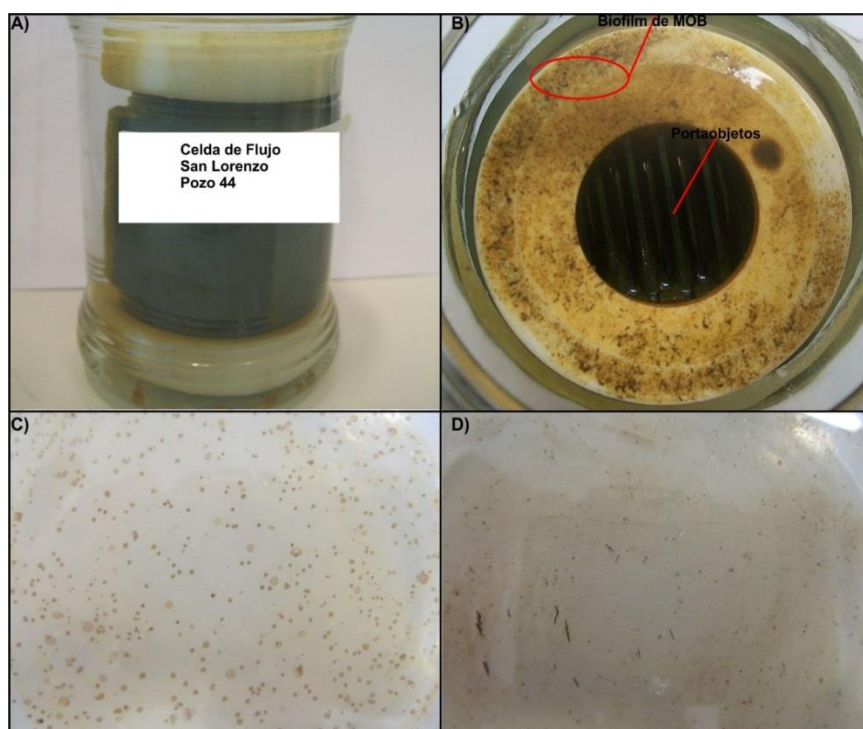
**Tabla 5.1. Análisis Físico-químico del Agua.** El análisis fue realizado por el CIS. Sitio de Extracción del agua: Pozo N° 44-San Lorenzo-Santa Fe.

Parámetro	Agua de SL
pH (20 °C)	$8,3 \pm 0,2$
Manganeso ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$0,14 \pm 0,05$
Hierro ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$< 0,05$
Amonio ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$< 0,05$
Nitrito ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$< 0,02$
Nitrato ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$8,0 \pm 0,1$
Sulfato ( $\text{mg L}^{-1}$ )	<u><math>490 \pm 4</math></u>
Bicarbonato ( $\text{mg L}^{-1}$ )	-
Fluoruro ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$0,7 \pm 2,0$
Cloruro ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$320 \pm 6$
Calcio ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$31 \pm 1$
Magnesio ( $\text{mg L}^{-1}$ )	29
Arsénico ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	28

**Calidad Físico-química del agua para consumo humano:** Los parámetros subrayados NO cumplen con los límites establecidos en el Código Alimentario Argentino, Capítulo XII: Bebidas Hídricas, Agua y Agua gasificada.

Por otro lado, se determinó que estas aguas estaban enriquecidas naturalmente con MOB. Dadas las dificultades involucradas en el aislamiento de

MOB directamente del agua cruda, donde la dilución es un factor muy importante, se utilizó la técnica de celda de flujo para la recolección por unión a superficie de biofilms bacterianos. Las celdas consistían en una cámara cilíndrica con 8 portaobjetos de microscopio en su interior (Figura 5.6. A y B) a través de los cuales fluía agua ( $2 \text{ L h}^{-1}$ ). Se utilizaron como superficie para recolectar bacterias provenientes del pozo 44, durante un período de 20 d en el sitio. Tal como se muestra en la Figura 5.4. (A y B), al recolectar las celdas de flujo se observó que las mismas estaban cubiertas en su superficie por biofilms bacterianos y por depósitos de óxidos de Mn, evidenciados por el color negro (señalado en la Figura 5.4.B con un círculo). Posteriormente se recolectaron muestras de estos biofilms con un ansa y se plaquearon en medio PC a fin de poder visualizar la presencia de MOB en el agua. Se decidió utilizar este medio de cultivo dado que es el medio más mínimo en composición comparando los tres medios descriptos en este trabajo, asumiendo que las bacterias capaces de crecer serán aquellas que soporten las condiciones del agua cruda donde hay poca materia orgánica disponible. Asimismo, dado que fueron capaces de formar biofilms sobre la superficie de los portaobjetos se puede suponer que es probable que colonicen la matriz del sistema de filtros, constituyendo una posible competencia natural para el inóculo con MOB-181. Tal como se muestra en la Figura 5.4. C y D, se recuperó una gran cantidad de MOB naturalmente presentes en el agua cruda, las cuales pueden reconocerse fácilmente por su color marrón en medio PC en presencia de Mn(II).



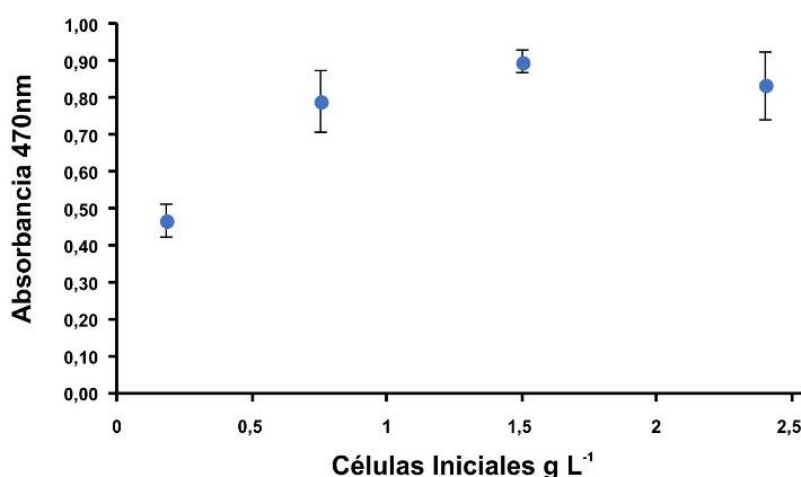
**Figura 5.4. Determinación de la presencia de MOB en el agua cruda de San Lorenzo.** En A) y B) se muestra una vista lateral y desde arriba de la celda de flujo utilizada para recolectar biofilms de bacterias presentes en el agua, respectivamente. En B) se señalan además los portaobjetos en el interior de la celda, que fueron utilizados como superficie para recolectar los biofilms de bacterias, y el aspecto de los biofilms de bacterias recubiertas de óxidos de Mn sobre la celda de flujo. En C) y D) se muestran fotos representativas de las placas donde se reconocieron los fenotipos de MOB recuperadas, se utilizó el Medio PC en presencia de Mn 100  $\mu$ M.

### 5.3.3 Estrategias de Inoculación

#### 5.3.3.1 Determinación de la Concentración de MOB-181 Óptima para Inocular en la Arena de los Filtros

A fin de determinar en qué concentración y en qué forma se debe aplicar el inoculante, en primer lugar, se puso a punto un ensayo que permitió evaluar tanto la capacidad de MOB-181 de adherirse a una matriz sólida como la viabilidad de las células adheridas utilizando la sal TTC. De este modo, tal como se describe en Materiales y Métodos se realizó el ensayo de adherencia de MOB-181 a la arena, partiendo de diferentes concentraciones de células, en presencia de TTC. Los resultados de la cantidad de formazán producido en función de la cantidad de células iniciales se informan en la Figura 5.5.

Se evaluaron cuatro concentraciones iniciales de células de MOB-181, expresadas en gramos de células por litro de cultivo (0,18; 0,75; 1,5 y 2,4 g L<sup>-1</sup>). Se observó que con la menor concentración de inóculo se obtiene una menor capacidad de adherencia a la arena, y que a partir de una concentración inicial de MOB-181 igual a 0,75 g L<sup>-1</sup>, se mantiene constante la cantidad de células adheridas sugiriendo que se alcanzó la capacidad máxima de adherencia porque se saturó la arena de bacterias (Figura 5.5.).



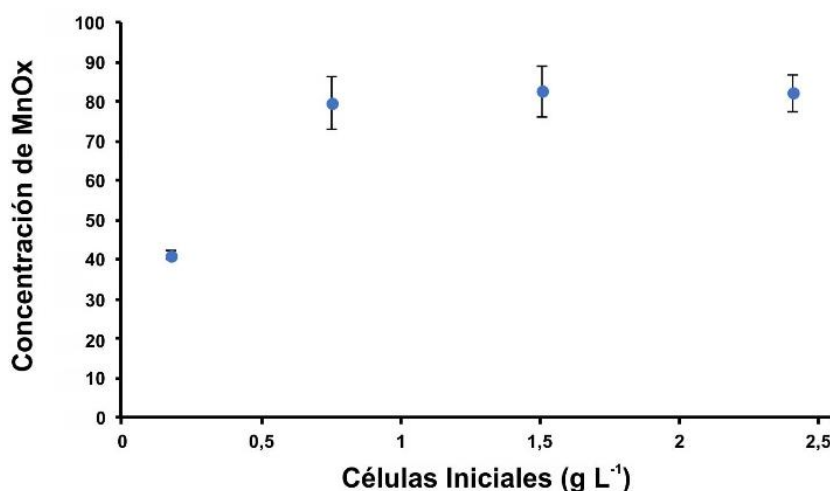
**Figura 5.5. Producción de formazán de células adsorbidas en la arena.** Distintas concentraciones iniciales de células de MOB-181, incubadas en presencia de TTC, fueron adsorbidas sobre la arena, y posteriormente se realizaron ensayos de cuantificación de formazán producido por las células viables adsorbidas. Se midió la absorbancia luego de la lisis de las células con etanol (Absorbancia<sub>470nm</sub>). Los resultados son el promedio de tres determinaciones y las barras de error la DS.

Por otro lado se probó un segundo ensayo, donde se evaluó indirectamente la cantidad de células adsorbidas sobre la arena, teniendo en cuenta su capacidad de oxidar el Mn(II) presente en el agua cruda de SL. Se consideró efectivo utilizar la cantidad de óxidos producidos luego de 3 d (cuantificación de Absorbancia<sub>618nm</sub> mediante reacción con LBB) como criterio para determinar cualitativamente la cantidad de células adsorbidas a la superficie: cuanta mayor oxidación de Mn(II), mayor cantidad de células oxidantes inmovilizadas.

Nuevamente, se evaluaron cuatro concentraciones iniciales de células de MOB-181, expresadas como gramos de células por litro de cultivo (0,18; 0,75; 1,5 y 2,4 g L<sup>-1</sup>). Se observó que la cantidad de células adsorbidas en la arena (determinada por la cantidad de óxidos de Mn(II) detectados) variaba dependiendo de la concentración de células iniciales (0,18 - 2,4 g L<sup>-1</sup>) (Figura



5.6.). Partiendo de una concentración de inicial de  $0,18 \text{ g L}^{-1}$  de MOB-181, las células que lograron adherirse a la arena generaron una concentración de  $41,25 \mu\text{M}$  de MnOx en el sobrenadante (Figura 5.6.), mientras que la concentración de MnOx resultante a partir de la inmovilización de las demás concentraciones de células iniciales alcanzó un mismo valor ( $\sim 80 \mu\text{M}$  MnOx) (Figura 5.6.). Estos resultados fueron similares a los resultados obtenidos a partir de la cuantificación de la producción de formazán de las células inmovilizadas en presencia de TTC (Figura 5.5).



**Figura 5.6. Oxidación de Mn de células adsorbidas en la arena.** Distintas concentraciones iniciales de células de MOB-181 fueron adsorbidas sobre la matriz y posteriormente se realizaron ensayos de oxidación de Mn(II) de células adsorbidas. Se midieron los MnOx presentes en el SN con el colorante LBB (Absorbancia  $_{618\text{nm}}$ ). Los resultados son el promedio de tres determinaciones y las barras de error la DS.

De este modo, mediante dos técnicas diferentes se pudo determinar que no hubo diferencia significativa para la cantidad de biomasa adherida a la arena respecto a la concentración inicial de MOB-181 a partir de una concentración inicial de células de  $0,75 \text{ g L}^{-1}$ . Comparando ambos ensayos, se determinó que una concentración inicial de células de  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  inoculadas en 20 g de arena es una condición óptima para la inmovilización de MOB-181 sobre la superficie de la arena.

Estos resultados se tuvieron en cuenta para desarrollar la metodología de inoculación del sistema de filtros.

### 5.3.4 Impacto de la Bioaumentación en la Capacidad de Remoción de Mn(II) de Aguas

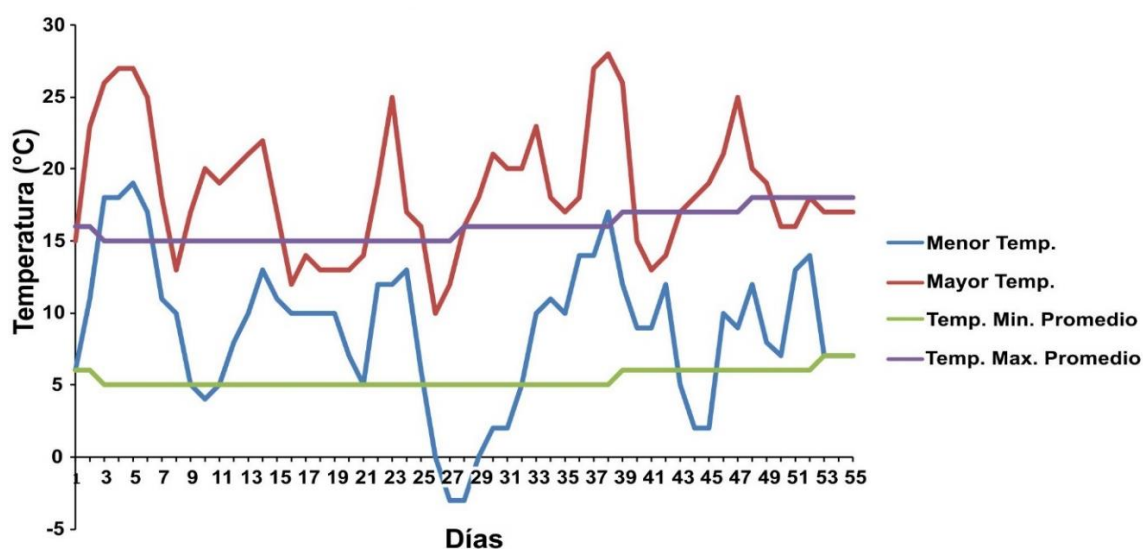
Para reponder las preguntas ¿Será efectiva la introducción de las bacterias elegidas? y ¿Qué pruebas hay de que el empleo de las bacterias obtenidas en este trabajo será mejor que las nativas? Se realizó un ensayo de Bioaumentación con MOB-181 a escala de laboratorio y se evaluó su actividad frente a un agua subterránea natural con presencia de MOB nativas (Tabla 5.1.).

#### 5.3.4.1 Primer Período de Estudio

- El primer período evaluado fue el invernal, abarcando desde el 21 de junio hasta el 14 de agosto de 2017. En esta primera sección, se describen las condiciones de los filtros (temperatura, pH, Oxígeno Disuelto (OD)), así como la evolución temporal de las concentraciones de Mn(II) en el influente y en los efluentes de ambas columnas durante la secuencia del tratamiento.

##### - Temperatura:

La Figura 5.7. resume los valores de variación de temperatura registrados durante este período invernal, se observó una oscilación de los valores entre -3 y 28 °C y una temperatura mínima promedio alrededor de los 5 °C y una máxima promedio cercana a los 15 °C.



[Fuente: [www.accuweather.com](http://www.accuweather.com), Rosario]

**Figura 5.7. Variación de la temperatura diaria para el Primer Periodo de estudio.**

- **Oxígeno Disuelto:**

Se realizaron mediciones de la concentración de OD en cada parte del sistema de filtros (Tabla 5.2.).

**Tabla 5.2. Medida aritmética de la concentración de OD en el sistema de filtros durante el primer periodo de estudio, junio-agosto 2017.**

Zona	Media (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	Desviación estándar (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )
Tanque influente	8,57	0,19
Efluente columna control	7,28	0,49
Efluente columna inoculada	6,62	0,78

- **pH:**

Se midieron los valores medios de pH tanto del agua influente como de los efluentes obtenidos diariamente a lo largo del del ensayo. En la Tabla 5.3. se describen los valores promedios y los respectivos desvíos estándar de todas las mediciones tomadas y, tal como se indica, no se observaron diferencias notables entre el pH de influente y los de las salidas de los efluentes.

**Tabla 5.3. Medida aritmética del pH en las diferentes etapas del sistema de filtros durante el primer periodo de estudio, junio-agosto 2017.**

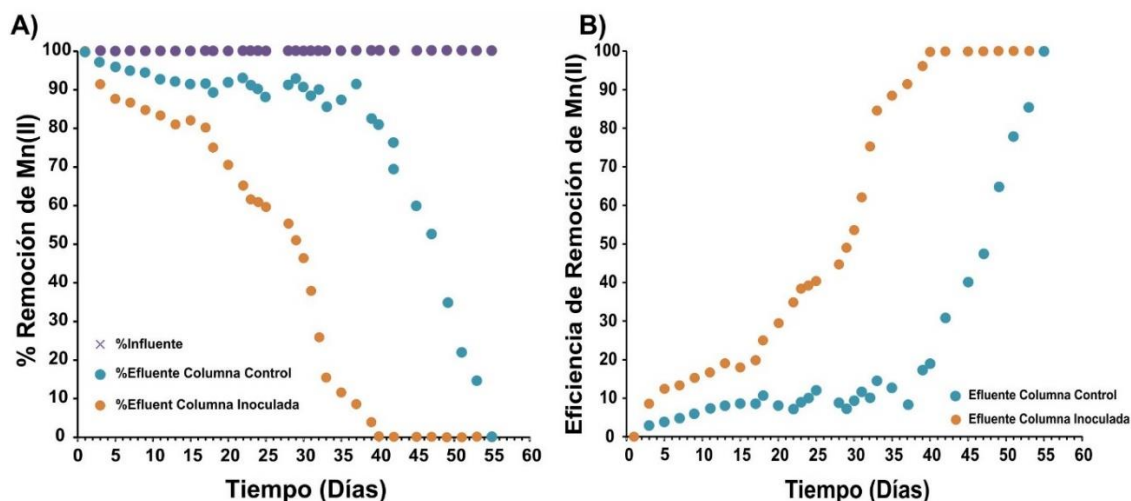
Zona	Media (pH)	Desviación estándar (pH)
Tanque influente	8,198	0,270
Efluente columna control	8,145	0,276
Efluente columna inoculada	8,135	0,238

- **Remoción de Mn(II)**

Se estudió la capacidad de remoción de la columna inoculada con MOB-181, cuantificando las concentraciones de Mn(II) del influente y efluente del sistema de filtros a diferentes tiempos (días) y se comparó con la del filtro control sin inocular. Se observó que la columna inoculada con MOB-181 comenzó a remover Mn(II) (aproximadamente un 10 % de remoción) a partir del inicio del experimento y alcanzó una remoción total del metal luego de 40 d de operación continua (Figura 5.8). La columna control comenzó a remover activamente recién a los 39 d de operación y alcanzó el 100 % de remoción 15 d después que la columna inoculada (día 55) (Figura 5.8.).

En la Figura 5.8. se puede observar además que, si bien al final del ensayo (día 55) el porcentaje de remoción de Mn(II) es similar en ambos filtros y cercano

al 100 % en ambos efluentes, la columna inoculada con MOB-181 logró eliminar el 100 % de Mn(II) luego de 40 d de operación continua, lo que resulta significativamente mayor a la eficiencia de remoción de la columna control en ese mismo tiempo, que removi6 solo el 20 % de Mn(II) (Figura 5.8.).



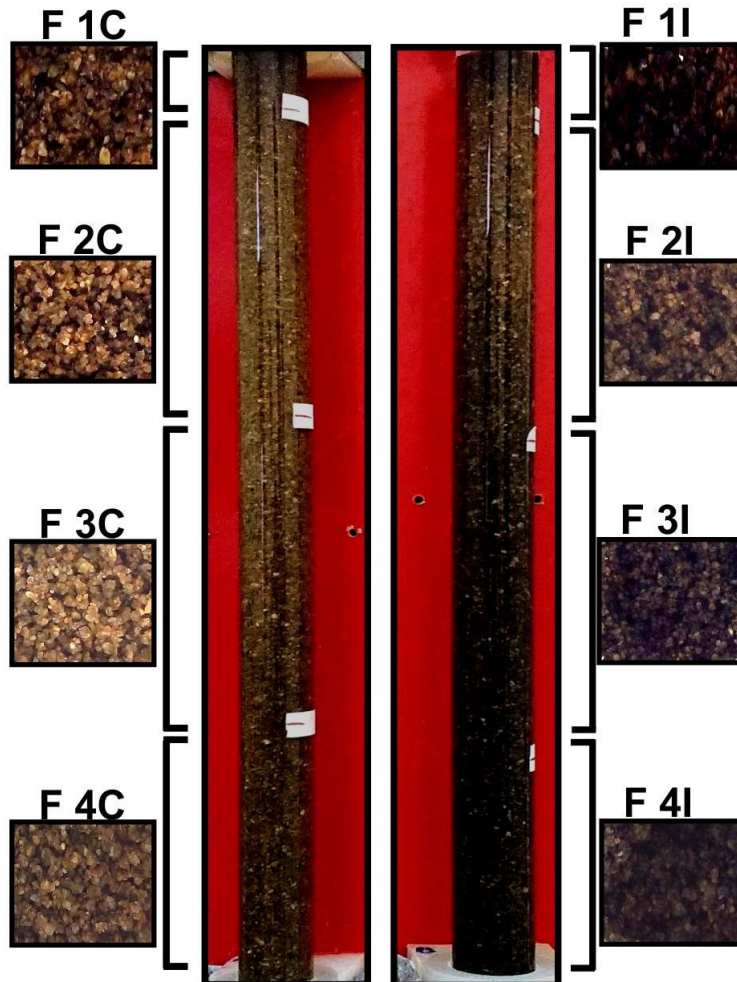
**Figura 5.8. Resultado de la remoción de Mn(II).** A) Se muestran las concentraciones de Mn(II) (%) en función del tiempo a la salida de la columna control sin inocular (azul), de la columna inoculada con MOB-181 (naranja) y del tanque de influente (violeta). B) Se grafic6 la eficiencia de la remoción de Mn(II) en la columna control sin inocular (azul) y en la columna inoculada con MOB-181 (naranja).

#### - Análisis de los Óxidos Depositados en la Arena

Durante este ensayo se pudo observar que el inicio de la remoción del Mn(II) del agua estuvo localizada en la capa superior de arena de ambos filtros. Esto fue revelado por una coloración oscura de la arena en dicha región, que representaba la acumulación de óxidos de Mn (Figura 5.9.). En el caso de la columna inoculada con MOB-181 (I), esta coloración se observ6 luego de 17 d de operación continua, mucho antes que la columna control, la cual mostr6 tales características 20 d más tarde. A lo largo del ensayo, en la columna inoculada se hizo más homogénea la distribución de óxidos, sin embargo, en la columna control (C), al menos en los tiempos ensayados en este estudio (55 d), la coloración qued6 más restringida a la zona superior (Figura 5.9.).

En base a estas observaciones, una vez finalizado el experimento (55 d), se registr6 fotográficamente el aspecto de ambos filtros. Posteriormente, se dividieron las dos columnas en cuatro secciones cada una (Figura 5.9.) y se recolect6 la arena de cada fracción para analizar por separado y realizar

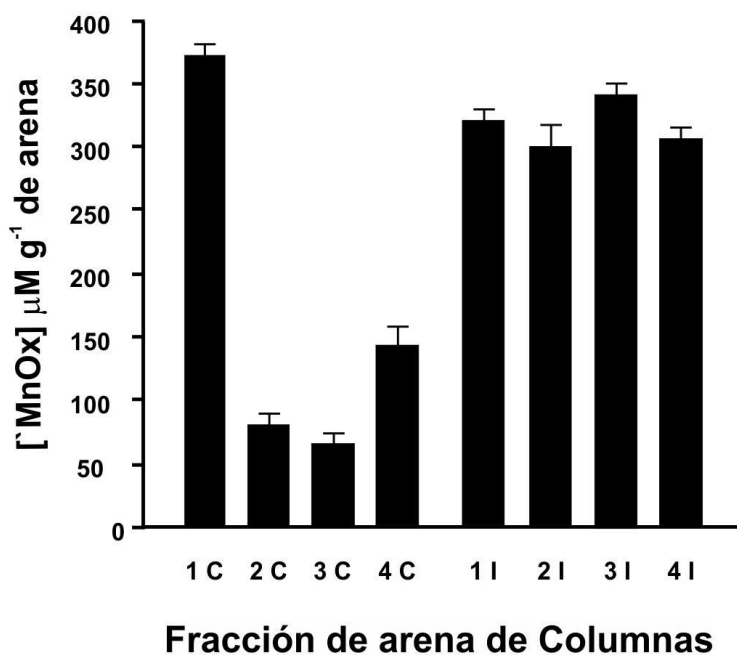
comparaciones. Tal como se puede observar, las fracciones de arena recuperadas de la columna inoculada (I) estaban mucho más negras que las de la columna control (C) (Figura 5.9.).



**Figura 5.9. Fraccionamiento de las columnas del período invernal.** Se muestra una fotografía de cómo quedó el sistema de filtros luego de finalizar el ensayo de remoción de Mn(II) en el primer período. Se indican las distintas fracciones de arena de las columnas control (C) e inoculada (I). La primera fracción (F 1) tiene una altura de manto de 5 cm; F 2 y F 3, 15 cm cada una; y, finalmente F 4 unos 10 cm de arena. Se realizó el mismo fraccionamiento para las dos columnas. Se muestran las fracciones resultantes de cada columna donde se puede notar la diferencia de color entre una fracción en una misma columna y entre las columnas control e inoculada debido a la cantidad de MnOx depositados.

A fin de confirmar que la coloración oscura se debía específicamente a la presencia de óxidos de Mn en la arena, se llevó a cabo una cuantificación mediante la reacción con el colorante azul de LBB. Tal como se muestra en la

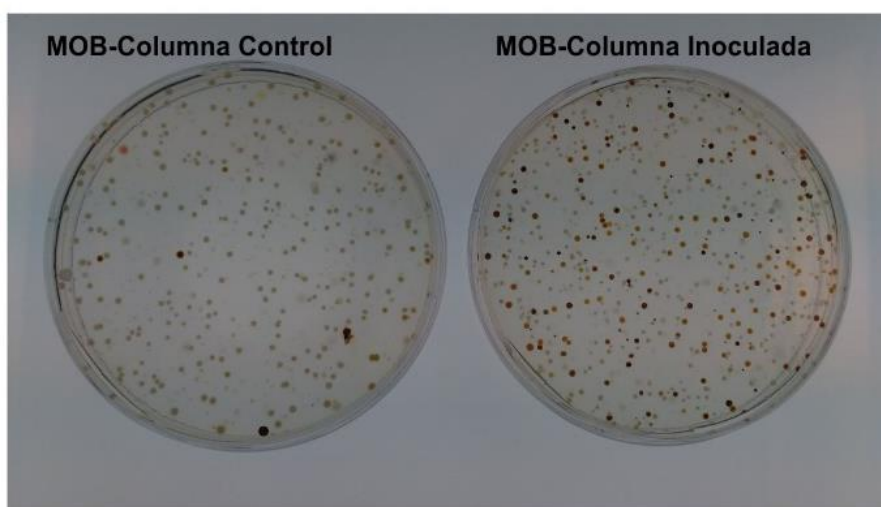
Figura 5.10., en el filtro inoculado se observó una acumulación de MnOx relativamente homogénea a lo largo de la columna, en comparación con el filtro control, que al final del ensayo había acumulado los MnOx principalmente en la capa superior de la arena (Figura 5.10.). Por otro lado, se puede observar que la concentración total de MnOx en la columna inoculada fue ampliamente superior que la de la columna control.



**Figura 5.10. Cuantificación de óxidos de Mn acumulados en las distintas fracciones en las columnas durante el primer período.** La concentración de MnOx se determinó en las fracciones de las columnas control (1C, 2C, 3C y 4C) e inoculada (1I, 2I, 3I y 4I). La cantidad de MnOx está expresada por gramo de arena ( $\mu\text{M g}^{-1}$  de arena). La misma se determinó con el colorante LBB y se construyó una curva de calibración con  $\text{KMnO}_4$  para determinar la concentración de MnOx producidos en cada caso. Los resultados son el promedio de tres determinaciones y las barras de error la DS.

A fin de determinar cuantitativamente la cantidad de MOB heterótrofas cultivables presentes en la arena de cada filtro se probaron distintos protocolos de vortexeado vigoroso y sonicación suave pero no se logró encontrar una metodología que permita obtener resultados reproducibles. Por lo tanto, se realizaron ensayos cualitativos, a fin de demostrar la presencia de MOB en ambos filtros (Figura 5.11). Para ello, se unieron las cuatro fracciones recuperadas de cada filtro y se realizó un plaqueo de las poblaciones cultivables de bacterias heterótrofas oxidantes de Mn(II) que se lograron desprender de la arena de los dos filtros, control e inoculado. Se reconocieron los distintos

morfotipos macroscópicos, colonias de color marrón oscuro en placas suplementadas con Mn(II) y tinción con LBB, y ausencia de tal coloración en placas sin Mn(II). Si bien estos ensayos no fueron cuantitativos, se pudo determinar que ambos filtros contenían MOB al finalizar el ensayo de remoción de Mn(II), y se pudo recuperar un mayor número de bacterias heterótrofas cultivables oxidantes de Mn(II) a partir del filtro inoculado respecto del filtro control (Figura 5.11.).



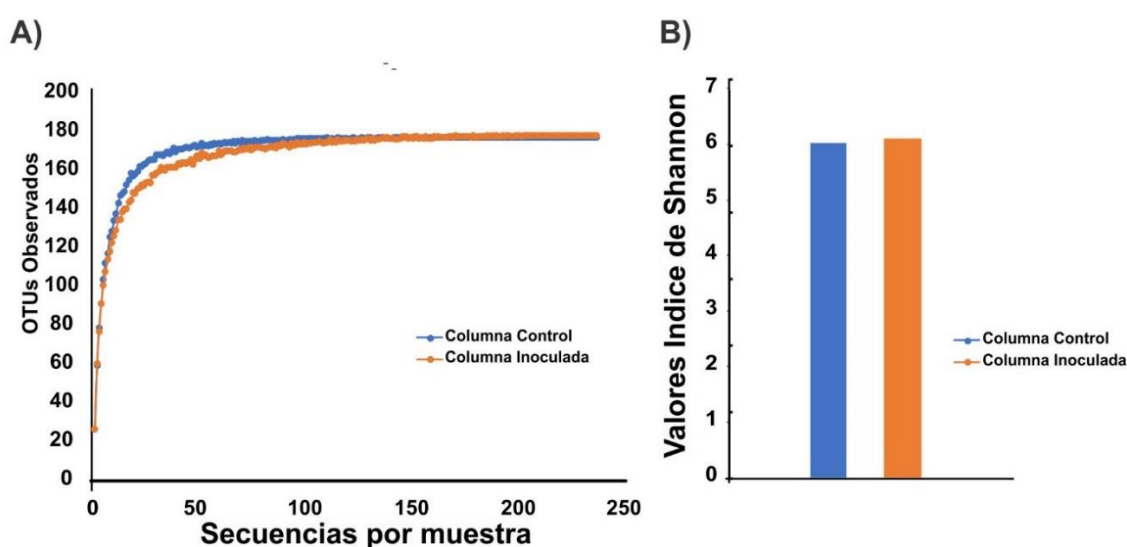
**Figura 5.11. Crecimiento de MOB heterótrofas cultivables al final del ensayo de remoción de Mn(II) del primer período.** Se muestra una fotografía representativa de las MOB heterótrofas cultivables obtenidas luego de 14 d de incubación en medio Lept a 28 °C. Las bacterias de color marrón fueron posteriormente repicadas en medio Lept sin Mn(II) para chequear que perdieran la coloración y además se les agregó una gota de LBB para confirmar la presencia de óxidos de Mn en las colonias.

#### **- Análisis de la Composición de las Comunidades Bacterianas Presentes en los Filtros**

Finalmente, para caracterizar las comunidades microbianas presentes en los filtros y evaluar el efecto del tratamiento durante el primer período, se realizó una comparación de la composición de las comunidades bacterianas entre las columnas inoculada y control, luego de los 55 d de operación continua del sistema. Para esto, se realizó la extracción del ADN total bacteriano de la mezcla de la arena de cada columna y posterior secuenciación masiva del gen 16S ARNr. Para poder identificar y estimar la sobrevida de MOB-181 luego del tratamiento, se incluyó en el análisis la secuencia del gen 16S ARNr (Capítulo 3) utilizada inicialmente para su identificación.



Las curvas de rarefacción de todos los microbiomas tendieron a una asíntota lo cual indica que la profundidad de la secuenciación fue suficiente para una exploración exhaustiva de las comunidades bacterianas presentes en ambas columnas. Las dos columna tuvieron similar riqueza de especies (Figura 5.12.A) y los índices de Shannon mostraron que la diversidad y riqueza en la columna control (Índice de Shannon: 6,022) fueron muy similares a las de la columna inoculada (Índice de Shannon: 6,102) al finalizar el tratamiento, Figura 5.12.B.



**Figura 5.12.  $\alpha$ -diversidad derivada de la secuenciación masiva de 16S ARNr de comunidades bacterianas recuperadas de la arena de las columnas al final del ensayo de remoción de Mn(II) del primer período.**

Aquellas secuencias con similitud  $>97\%$  se trataron como unidades taxonómicas operativas y fueron consideradas como especies "estrechamente relacionadas". (A) Las curvas indican el número de OTUs observados (eje y) para las columnas luego del ensayo de remoción de Mn(II) de aguas de la Columna Control y Columna Inoculada obtenidos una vez finalizado el ensayo de remoción del primer período en función del número de lecturas (eje x).

(B) Índice de Shannon para representar la diversidad de bacterias de cada muestra recuperada de la columna control y columna inoculada con MOB-181. La diversidad y la riqueza bacteriana, estimada por el índice de diversidad de Shannon a partir de los datos de OTU, fue muy similar para las muestras obtenidas de la columna control y de la columna inoculada.

Las OTU identificadas representaron a 14 filos bacterianos diferentes. Las proteobacterias fueron el filo más abundante en ambas columnas, pero su abundancia fue mayor en la columna inoculada (52,8 %) que en la columna control (41,8 %) (Tabla 5.4.). Además, dos filos bacterianos *Spirochaetes* y



*Synergistetes* fueron encontrados únicamente en la columna control. El resto de los filos fueron comunes en ambas columnas (Tabla 5.4.).

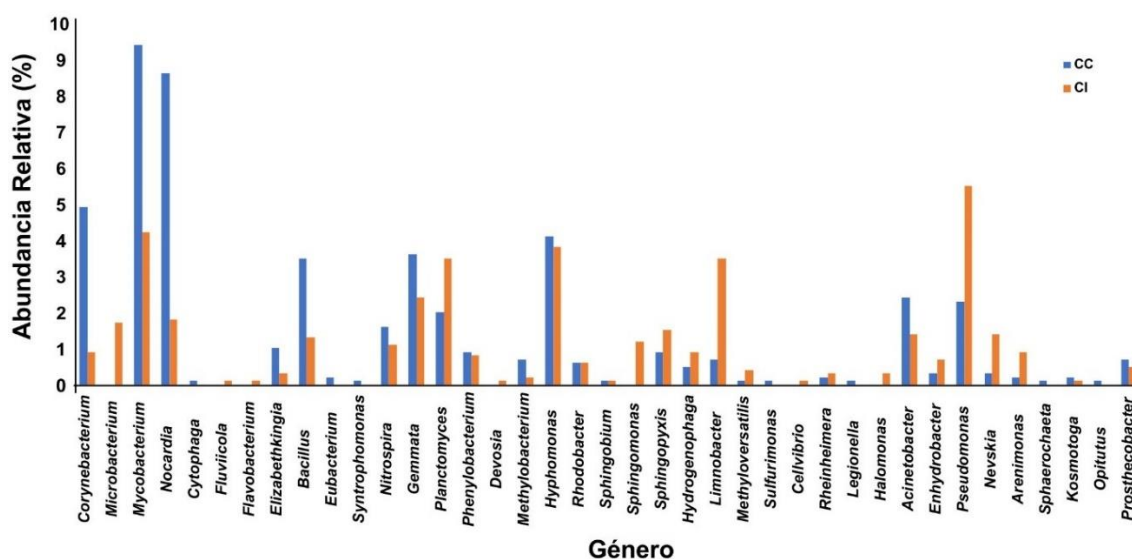
**Tabla 5.4. Abundancia relativa de los principales filos bacterianos identificados en cada columna al finalizar el ensayo de remoción de Mn(II) del primer período.**

Taxonomía	% CC	% CI
<i>Acidobacteria</i>	1,1	1,0
<i>Actinobacteria</i>	22,8	8,6
<i>Armatimonadetes</i>	1,1	4,3
<i>Bacteroidetes</i>	5,4	7,5
<i>Chlamydiae</i>	0,4	0,2
<i>Cyanobacteria</i>	0,2	0,3
<i>Firmicutes</i>	4,1	1,4
<i>Nitrospirae</i>	1,6	1,1
<i>Planctomycetes</i>	16,5	16,8
<i>Proteobacteria</i>	41,8	52,8
<i>Spirochaetes</i>	0,2	0,0
<i>Synergistetes</i>	0,3	0,0
<i>Thermotogae</i>	0,2	0,1
<i>Verrucomicrobia</i>	1,7	3,3

El análisis basado en los perfiles de la comunidad bacteriana a nivel del género se detalla en la Tabla 5.5 y en la Figura 5.13. Se observa claramente que la inoculación condujo a algunos cambios en la población bacteriana resultante. Los datos obtenidos mostraron que las poblaciones pertenecientes al género *Pseudomonas* aumentaron en la columna inoculada (5,5 %) con respecto a la columna control (2,3 %) (Figura 5.13. y Tabla 5.5.). También se observó una dominancia significativa de los géneros *Microbacterium*, *Planctomyces*, *Sphingomonas*, *Limnobacter*, *Nevskia* y *Arenimonas* en la columna inoculada con MOB-181 (Figura 5.13. y Tabla 5.5.). Por otro lado, se observa una disminución de la población de los géneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Bacillus* y *Acinetobacter* en la columna inoculada respecto de la columna control (Figura 5.13. y Tabla 5.5.).

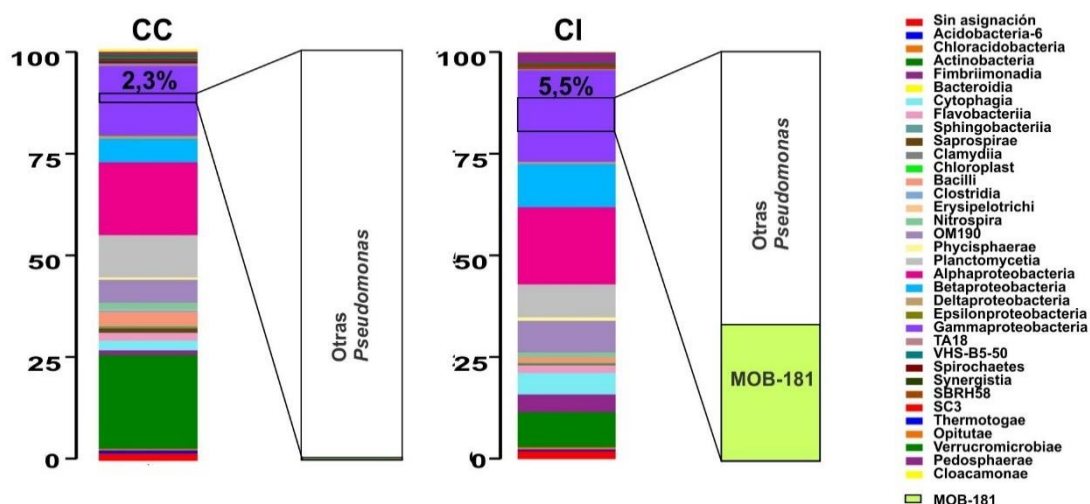
**Tabla 5.5. Abundancia relativa de los principales géneros bacterianos identificados en cada columna al finalizar el ensayo de remoción de Mn(II) del primer período.**

Filo	Género	% CC	% CI
<i>Actinobacteria</i>	<i>Corynebacterium</i>	4,9	0,9
<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacterium</i>	0,0	1,7
<i>Actinobacteria</i>	<i>Mycobacterium</i>	9,4	4,2
<i>Actinobacteria</i>	<i>Nocardia</i>	8,6	1,8
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Cytophaga</i>	0,1	0,0
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Fluviicola</i>	0,0	0,1
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacterium</i>	0,0	0,1
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Elizabethkingia</i>	1,0	0,3
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus</i>	3,5	1,3
<i>Firmicutes</i>	<i>Eubacterium</i>	0,2	0,0
<i>Firmicutes</i>	<i>Syntrophomonas</i>	0,1	0,0
<i>Nitrospirae</i>	<i>Nitrospira</i>	1,6	1,1
<i>Planctomycetes</i>	<i>Gemmata</i>	3,6	2,4
<i>Planctomycetes</i>	<i>Planctomyces</i>	2,0	3,5
<i>Proteobacteria (Alfa)</i>	<i>Phenylobacterium</i>	0,9	0,8
<i>Proteobacteria (Alfa)</i>	<i>Devosia</i>	0,0	0,1
<i>Proteobacteria (Alfa)</i>	<i>Methylobacterium</i>	0,7	0,2
<i>Proteobacteria (Alfa)</i>	<i>Hyphomonas</i>	4,1	3,8
<i>Proteobacteria (Alfa)</i>	<i>Rhodobacter</i>	0,6	0,6
<i>Proteobacteria (Alfa)</i>	<i>Sphingobium</i>	0,1	0,1
<i>Proteobacteria (Alfa)</i>	<i>Sphingomonas</i>	0,0	1,2
<i>Proteobacteria (Alfa)</i>	<i>Sphingopyxis</i>	0,9	1,5
<i>Poteobacteria (Beta)</i>	<i>Hydrogenophaga</i>	0,5	0,9
<i>Poteobacteria (Beta)</i>	<i>Limnobacter</i>	0,7	3,5
<i>Poteobacteria (Beta)</i>	<i>Methyloversatilis</i>	0,1	0,4
<i>Proteobacteria (Epsilon)</i>	<i>Sulfurimonas</i>	0,1	0,0
<i>Proteobacteria (Gama)</i>	<i>Cellvibrio</i>	0,0	0,1
<i>Proteobacteria (Gama)</i>	<i>Rheinheimera</i>	0,2	0,3
<i>Proteobacteria (Gama)</i>	<i>Legionella</i>	0,1	0,0
<i>Proteobacteria (Gama)</i>	<i>Halomonas</i>	0,0	0,3
<i>Proteobacteria (Gama)</i>	<i>Acinetobacter</i>	2,4	1,4
<i>Proteobacteria (Gama)</i>	<i>Enhydrobacter</i>	0,3	0,7
<i>Proteobacteria (Gama)</i>	<i>Pseudomonas</i>	2,3	5,5
<i>Proteobacteria (Gama)</i>	<i>Nevskia</i>	0,3	1,4
<i>Proteobacteria (Gama)</i>	<i>Arenimonas</i>	0,2	0,9
<i>Spirochaetes</i>	<i>Sphaerochaeta</i>	0,1	0,0
<i>Thermotogae</i>	<i>Kosmotoga</i>	0,2	0,1
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Opitutus</i>	0,1	0,0
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Prostheco bacter</i>	0,7	0,5



**Figura 5.13. Diferencias en abundancias relativas a nivel de género de las comunidades bacterianas en las columnas control e inoculada al finalizar el ensayo de remoción de Mn(II) del primer período.**

En la figura 5.14. se representa el porcentaje de *Pseudomonas* que corresponden dentro de la categoría de las Gammaproteobacterias, además, se incluyó el análisis que se realizó con la secuencia de MOB-181 para calcular su abundancia dentro de las columnas. Se determinó que las secuencias idénticas a la *Pseudomonas* MOB-181 representaban el 33,46 % de las *Pseudomonas* totales en la columna inoculada, lo cual fue significativamente más alto que en la columna control (0,57 %).



**Figura 5.14. Abundancias de OTUs dominantes y proporción de *Pseudomonas* en las columnas inoculadas (CI) y control (CC).**

Gráfico de barras, basado en los OTUs bacterianos más abundantes detectadas en las columnas control (CC) e inoculada (CI). Se muestra representativamente con un cuadro las abundancias del género *Pseudomonas* dentro del grupo de las Gammaproteobacterias. Asimismo, se indica la proporción total de *Pseudomonas* que corresponde a MOB-181.

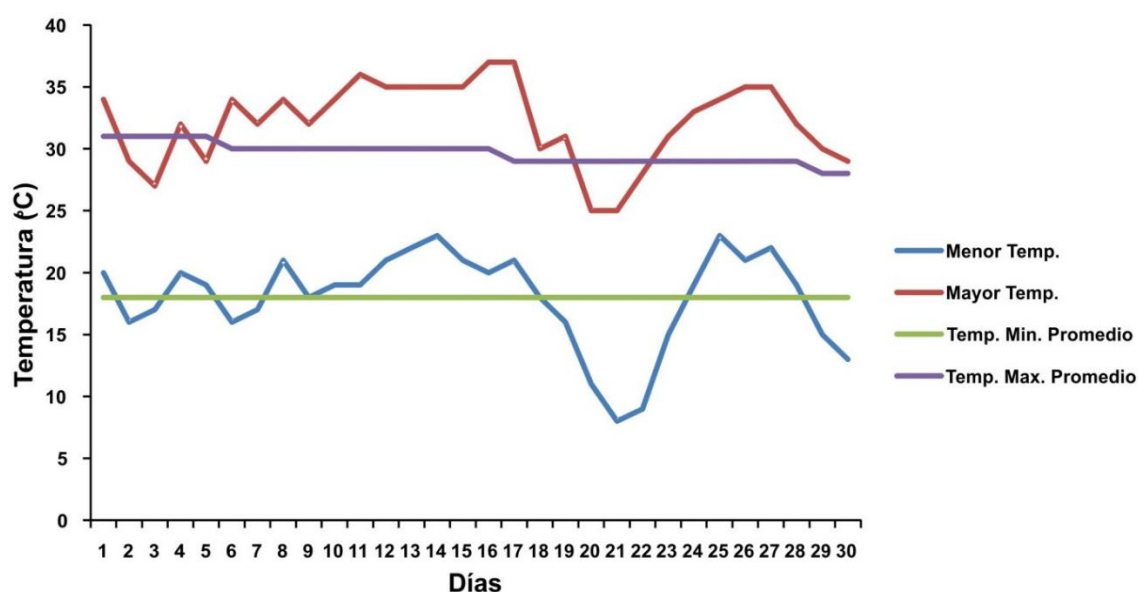
#### 5.3.4.2 Segundo Período de Estudio

A continuación, se presenta el análisis del segundo período evaluado, en época de verano, abarcando desde el 21 de enero hasta el 20 de febrero de 2018. En esta sección se muestran las condiciones del sistema de filtros (temperatura, pH, OD), así como la evolución temporal de las concentraciones de Mn(II) en el influente y en los efluentes de ambas columnas durante la secuencia del tratamiento.

##### - Temperatura:

Los valores máximos, mínimos y medios de temperatura registrados durante el segundo período de estudio se muestran en la Figura 5.15. Los mismos oscilaron entre 8 y 37 °C, con un valor mínimo promedio de 18 °C y un valor máximo promedio de alrededor de 30 °C. Se puede apreciar que los valores de temperatura registrados aquí fueron mucho más altos que los del primer período en estudio (Figura 5.7.). Asimismo, un amplio intervalo de las temperaturas registradas a lo largo de este período (18 - 37 °C) se encuentra dentro de los valores registrados para el desarrollo óptimo de la actividad

oxidante de Mn(II) de la bacteria MOB-181 de acuerdo con los estudios realizados en el Tercer Capítulo.



[Fuente: [www.accuweather.com](http://www.accuweather.com), Rosario]

**Figura 5.15 Variación de la temperatura diaria para el Segundo Período de estudio.**

#### - Oxígeno Disuelto:

En la Tabla 5.6. se indican los valores medios y la desviación estándar de la concentración de OD en cada parte del sistema de remoción de Mn(II),

**Tabla 5.6. Medida aritmética de la concentración de OD en el sistema de filtros durante el segundo período de estudio, enero-febrero 2018.**

Zona	Media (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	Desviación estándar (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )
Tanque influente	7,4	0,29
Efluente columna control	6,1	0,63
Efluente columna inoculada	5,5	0,86

Como ocurrió en el primer período, la concentración de OD del agua influente se mantuvo por encima de 5 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> correspondiendo a un sistema aerobio propicio para el crecimiento bacteriano.

- **pH:**

En la Tabla 5.7. se describen los valores medios de pH registrados y sus respectivas desviaciones estándar, tanto del influente como de los efluentes obtenidos a lo largo de todo este período de estudio. Al igual que lo que ocurrió durante los meses de invierno, en este período tampoco se observaron grandes diferencias en el agua del influente y los diferentes efluentes de las columnas.

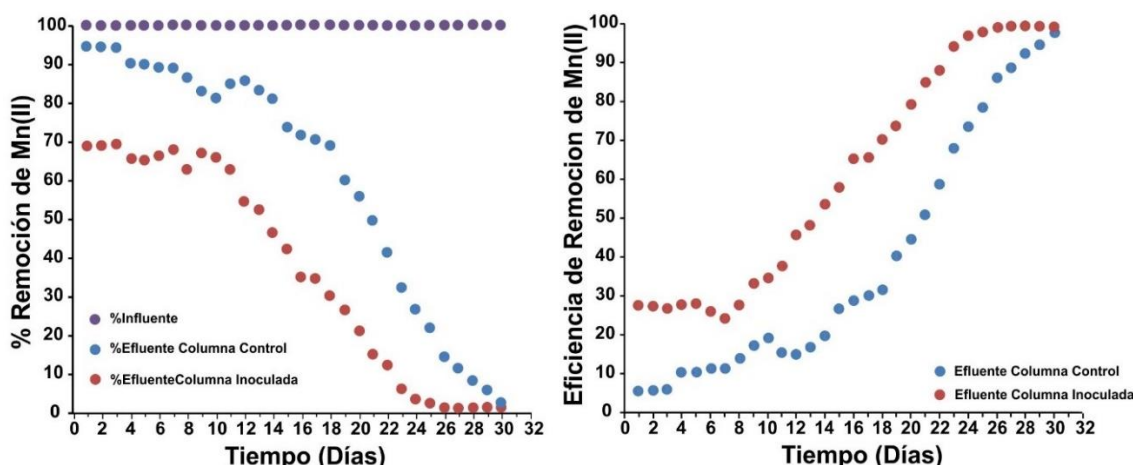
**Tabla 5.7. Medida aritmética del pH en las diferentes etapas del sistema de filtros durante el segundo período de estudio, enero-febrero 2018.**

<b>Zona</b>	<b>Media (pH)</b>	<b>Desviación estándar (pH)</b>
Tanque influente	8,47	0,09
Efluente columna control	8,42	0,10
Efluente columna inoculada	8,43	0,15

- **Remoción de Mn(II)**

Para este segundo período, tal como en el período invernal, se cuantificaron las concentraciones de Mn(II) del influente y efluente del sistema de filtros a diferentes tiempos (días) y se comparó con la del filtro control sin inocular. En la Figura 5.16. se muestran los resultados obtenidos y lo primero a resaltar, es que en este segundo ensayo se alcanzó el 100 % de remoción de Mn(II) del agua mucho tiempo antes que en el ensayo del primer período (Figura 5.8.).

En la columna inoculada, se observó una diferencia importante respecto del porcentaje de remoción a partir del inicio del experimento de alrededor de un 30 %, en comparación con la columna control que registró apenas un 5 % de remoción de Mn(II). A los 26 d de funcionamiento continuo del sistema, se logró un porcentaje de remoción de Mn(II) igual al 100 % en la columna inoculada, mientras que en la columna control, la remoción total de Mn(II) se alcanzó a los 30 d (Figura 5.16.).

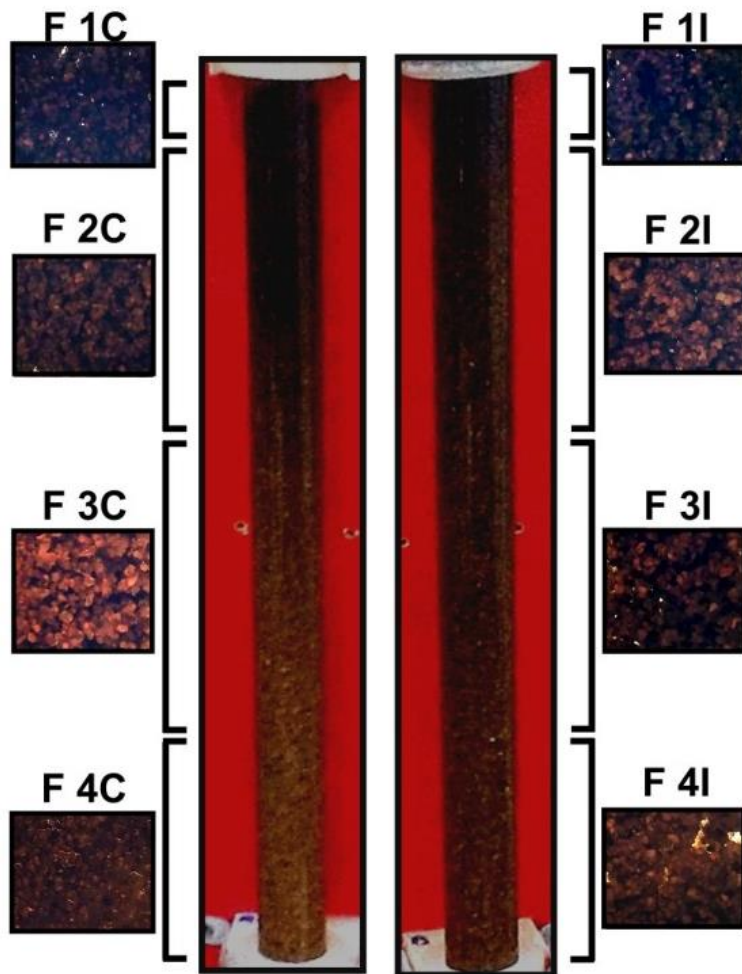


**Figura 5.16. Resultado de la remoción de Mn(II).** A) Se muestran los porcentajes de Mn(II) en función del tiempo de la columna control sin inocular (azul), de la columna inoculada con MOB-181 (rojo) y del tanque de influente (violeta). B) Se calculó la eficiencia de la remoción de Mn(II) en la columna control sin inocular (azul), de la columna inoculada con MOB-181 (rojo).

#### - Análisis de los Óxidos Depositados en la Arena

Al igual que en el ensayo del primer período, se observó que el inicio de la oxidación de Mn(II) estuvo dada en la parte superior de ambos filtros, revelado por una coloración oscura de la arena en dicha región debido a los MnOx (Figura 5.17). En este ensayo, los tiempos estuvieron más acelerados en comparación con los del primer período y esto también se vio reflejado en el aspecto de las columnas. Al cabo de una semana de operación continua, se empezó a observar la coloración oscura en la parte superior de la arena de la columna control, pero para este tiempo, la columna inoculada ya había adquirido tal coloración en su totalidad. A lo largo del ensayo aumentó la acumulación de MnOx por la columna control (C), y al menos en los tiempos ensayados en este estudio (30 d), la coloración quedó restringida a la mitad superior del total de la arena (Figura 5.17.).

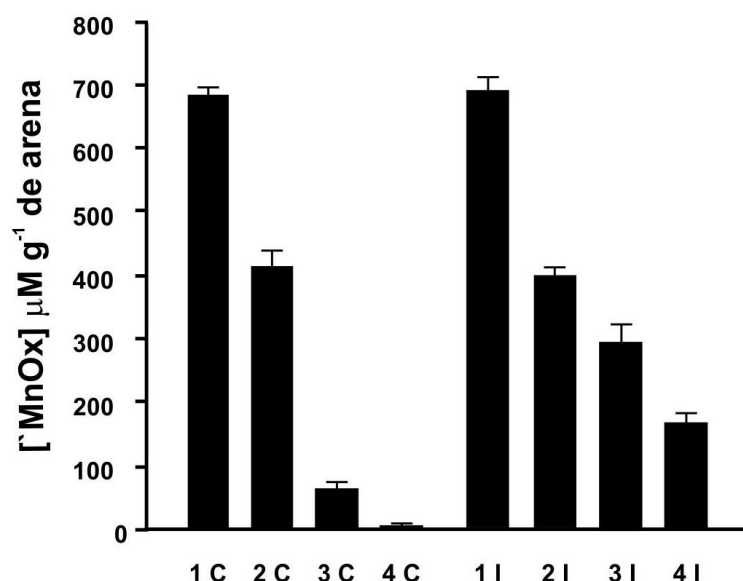
Se registraron fotográficamente estas observaciones una vez finalizado el experimento (30 d). Se dividieron las dos columnas en cuatro secciones cada una (Figura 5.17.) y se recolectó arena de cada sección. Como se puede apreciar a simple vista en la Figura 5.17., las fracciones de arena recuperadas de la columna inoculada presentaban un color más oscuro que las de la columna control. Las fracciones 1 y 2 fueron las más oscuras de la columna control.



**Figura 5.17. Fraccionamiento de las columnas del período de verano.** Se muestra una fotografía de cómo quedó el sistema de filtros luego de finalizar el ensayo de remoción de Mn(II) en el segundo período. Se indican las distintas fracciones de arena de las columnas control (C) e inoculada (I). La primera fracción (F 1) tiene una altura de manto de 5 cm; F 2 y F 3, 15 cm cada una; y, finalmente F 4 unos 10 cm de arena. Se realizó el mismo fraccionamiento para las dos columnas. Se muestran las fracciones resultantes de cada columna donde se puede notar la diferencia de color entre una fracción en una misma columna y entre las columnas control e inoculada debido a la cantidad de MnOx depositados.

La cuantificación de MnOx para cada una de las fracciones de los filtros al final del ensayo mostró una mayor acumulación de MnOx totales a lo largo de las fracciones en el filtro inoculado, mientras que en la columna control se observó una acumulación significativa de MnOx únicamente en las fracciones 1 y 2 (Figura 5.18).

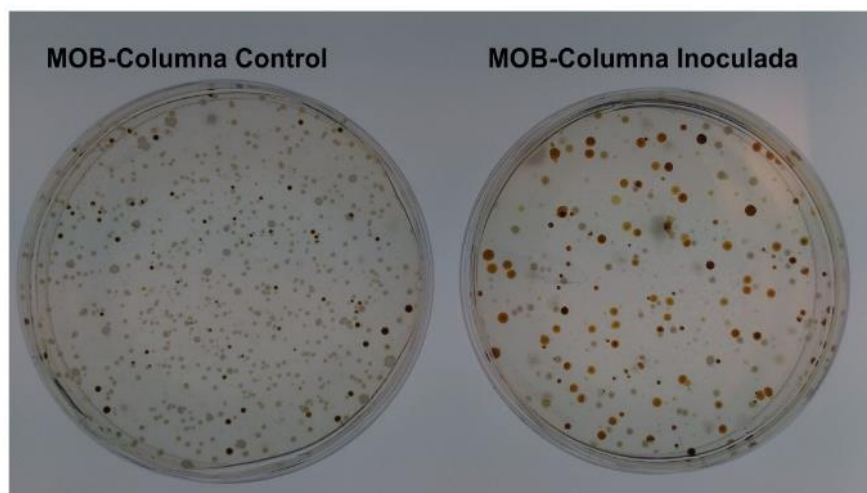




### Fracción de arena de Columnas

**Figura 5.18. Cuantificación de óxidos de Mn acumulados en las distintas fracciones en las columnas durante el segundo período.** La concentración de MnOx se determinó en las fracciones de las columnas control (1C, 2C, 3C y 4C) e inoculada (1I, 2I, 3I y 4I). La cantidad de MnOx está expresada por gramo de arena ( $\mu\text{M g}^{-1}$  de arena). La misma se determinó con el colorante LBB y se construyó una curva de calibración con  $\text{KMnO}_4$  para determinar la concentración de MnOx producidos en cada caso. Los resultados son el promedio de tres determinaciones y las barras de error la DS.

Los ensayos cualitativos de la mezcla de las cuatro fracciones, mostraron la presencia de MOB en ambos filtros (Figura 5.19). Al igual que en el primer período, se pudo determinar que ambos filtros contenían MOB al finalizar el ensayo de remoción de  $\text{Mn(II)}$ , y se pudo recuperar un mayor número de bacterias heterótrofas cultivables oxidantes de  $\text{Mn(II)}$  a partir del filtro inoculado respecto del filtro control (Figura 5.19.).

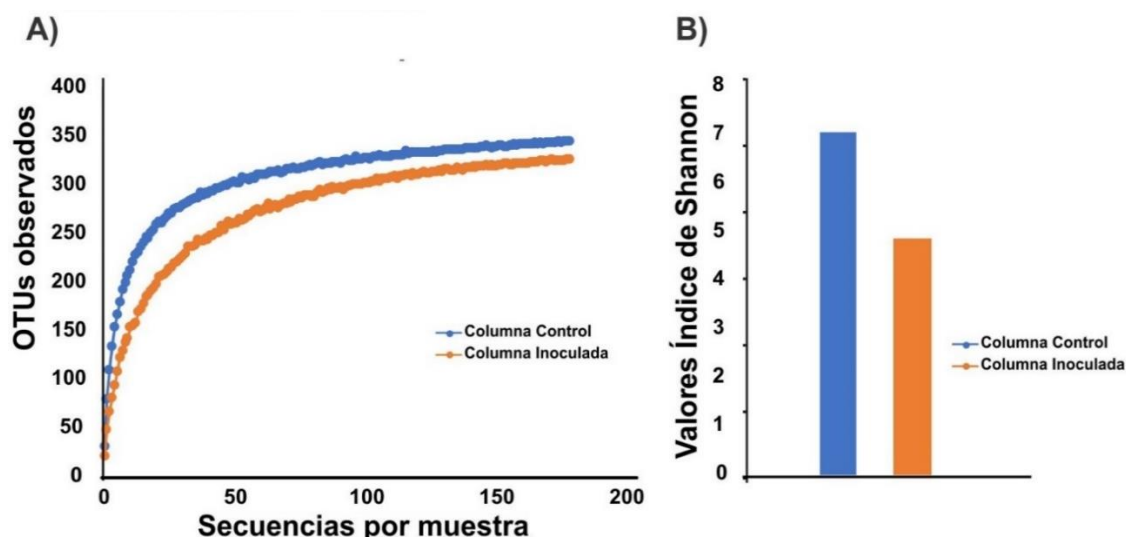


**Figura 5.19. Crecimiento de MOB heterótrofas cultivables al final del ensayo de remoción de Mn(II) del segundo período.** Se muestra una fotografía de las MOB heterótrofas cultivables obtenidas luego de 14 d de incubación en medio Lept a 28 °C. Las bacterias de color marrón fueron posteriormente repicadas en medio Lept sin Mn(II) para chequear que perdieran la coloración y además se les agregó una gota de LBB para confirmar la presencia de óxidos de Mn en las colonias.

#### - **Análisis de la Composición de las Comunidades Bacterianas en la Arena luego del Período de Verano**

Finalmente, para caracterizar las comunidades bacterianas presentes en los filtros y evaluar el efecto del tratamiento de este segundo período, se analizó su composición de bacterias del mismo modo que se describió para el primer período.

Las curvas de rarefacción tendieron a una asíntota indicando que la profundidad de secuenciación fue suficiente para una exploración exhaustiva de las comunidades bacterianas presentes en ambas columnas. La columna control tuvo mayor riqueza de especies respecto de la columna inoculada (Figura 5.20.A). Los índices de Shannon mostraron que en la diversidad y riqueza en la columna control (Índice de Shannon: 7,069) fueron significativamente más altas que las de la columna inoculada (Índice de Shannon: 4,859) al finalizar el tratamiento, Figura 5.20.B.



**Figura 5.20.  $\alpha$ -diversidad derivada de la secuenciación masiva de 16S ARNr de comunidades bacterianas recuperadas de la arena de las columnas al final del ensayo de remoción de Mn(II) del primer período.**

Aquellas secuencias con similitud  $>97\%$  se trataron como unidades taxonómicas operativas y fueron consideradas como especies "estrechamente relacionadas". (A) Las curvas indican el número de OTUs observados (eje y) para las columnas luego del ensayo de remoción de Mn(II) de aguas de la columna control y columna inoculada obtenidos una vez finalizado el ensayo de remoción del segundo período en función del número de lecturas (eje x).

(B) Índice de Shannon para representar la diversidad de bacterias de cada muestra recuperada de la columna control y columna inoculada con MOB-181. La diversidad y la riqueza bacteriana, estimada por el índice de diversidad de Shannon a partir de los datos de OTU, fue mayor para las muestras obtenidas de la columna control respecto de la columna inoculada.

Las OTU identificadas, representaron a 15 filos bacterianos diferentes. Las *Proteobacterias* fueron el filo más abundante presente en ambas columnas y la abundancia fue mayor en la columna inoculada (60,2 %) que en la columna control (41,5 %), Tabla 5.8. Además, dos filos bacterianos *Armatimonadetes*, y *Chlorobi* fueron encontrados únicamente en la columna control. El resto de los filos encontrados fueron idénticos en ambas columnas, Tabla 5.8.

**Tabla 5.8. Abundancia relativa de los principales filos bacterianos identificados en cada columna al finalizar el ensayo de remoción de Mn(II) del segundo período.**

Filo	% CC	% CI
<i>Acidobacteria</i>	6,7	3,3
<i>Actinobacteria</i>	5,6	11,6
<i>Armatimonadetes</i>	0,2	0,0
<i>Bacteroidetes</i>	9,8	4,3
<i>Chlamydiae</i>	0,5	0,1
<i>Chlorobi</i>	0,4	0,0
<i>Chloroflexi</i>	0,2	0,1
<i>Cyanobacteria</i>	0,7	0,3
<i>Firmicutes</i>	0,3	1,5
<i>Gemmatimonadetes</i>	0,1	0,2
<i>Nitrospirae</i>	7,8	4,0
<i>Planctomycetes</i>	10,7	7,7
<i>Proteobacteria</i>	41,5	60,2
<i>Spirochaetes</i>	0,5	0,1
<i>Verrucomicrobia</i>	4,4	3,0

El análisis basado en los perfiles de la comunidad bacteriana a nivel del género y sus abundancias relativas se detalla en la Tabla 5.9 en la Figura 5.21.A y Figura 5.21.B. Las secuencias pertenecientes al género *Pseudomonas* representaron un 37,4 % en la columna inoculada y fueron significativamente más altas que en la columna control (0,7 %).

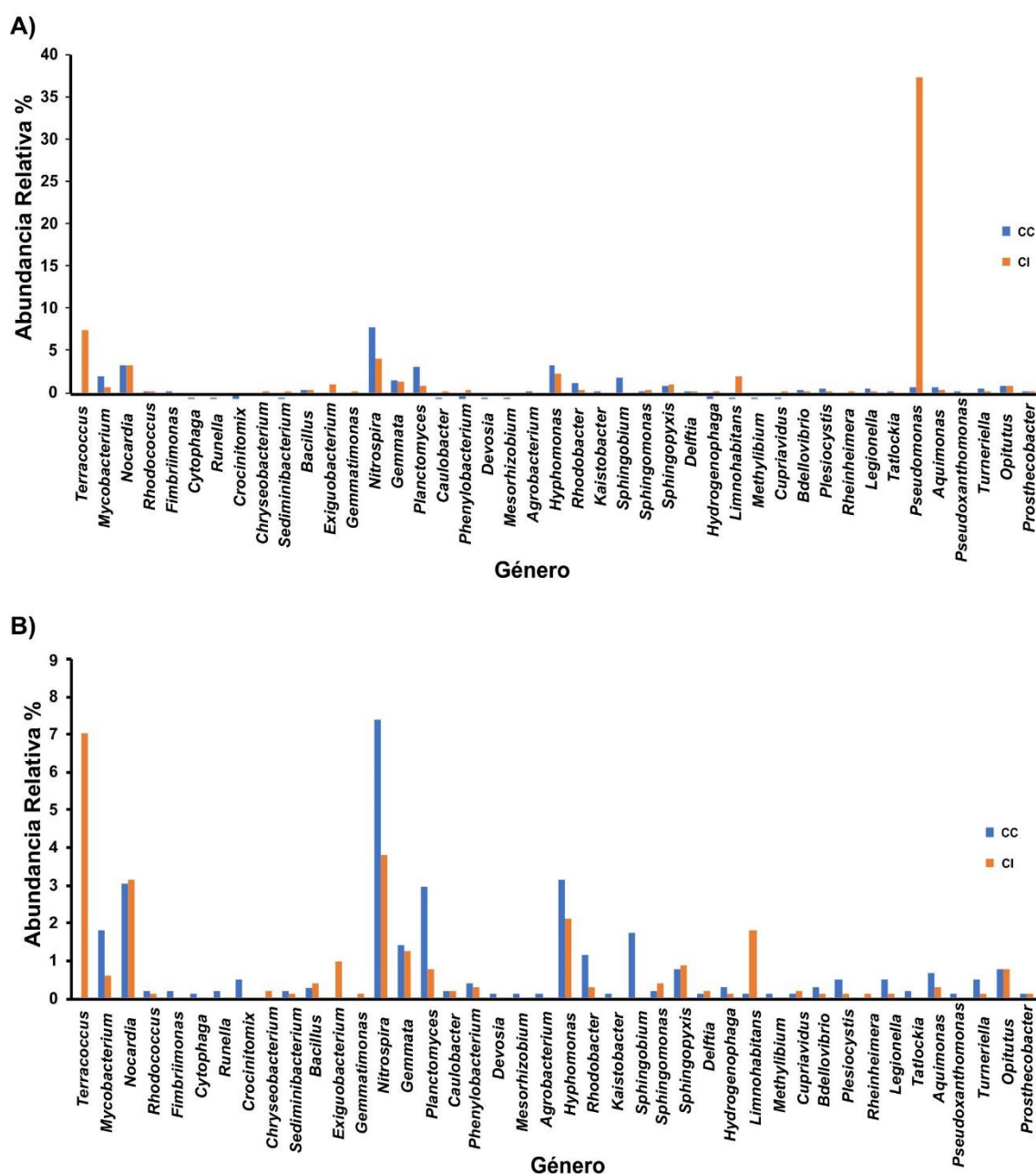
**Tabla 5.9. Abundancia relativa de los principales géneros bacterianos identificados en cada columna al finalizar el ensayo de remoción de Mn(II) del segundo período.**

Filo	Género	% CC	% CI
<i>Actinobacteria</i>	<i>Terracoccus</i>	0,0	7,4
<i>Actinobacteria</i>	<i>Mycobacterium</i>	1,9	0,6
<i>Actinobacteria</i>	<i>Nocardia</i>	3,2	3,3
<i>Actinobacteria</i>	<i>Rhodococcus</i>	0,2	0,1
<i>Armatimonadetes</i>	<i>Fimbriimonas</i>	0,2	0,0
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Cytophaga</i>	0,1	0,0
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Runella</i>	0,2	0,0
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Crocinitomix</i>	0,5	0,0
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Chryseobacterium</i>	0,0	0,2
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Sediminibacterium</i>	0,2	0,1
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus</i>	0,3	0,4
<i>Firmicutes</i>	<i>Exiguobacterium</i>	0,0	1,0
<i>Gemmatimonadetes</i>	<i>Gemmatimonas</i>	0,0	0,1
<i>Nitrospirae</i>	<i>Nitrospira</i>	7,8	4,0
<i>Planctomycetes</i>	<i>Gemmata</i>	1,5	1,3
<i>Planctomycetes</i>	<i>Planctomyces</i>	3,1	0,8
<i>Proteobacteria (Alpha)</i>	<i>Caulobacter</i>	0,2	0,2
<i>Proteobacteria (Alpha)</i>	<i>Phenylobacterium</i>	0,4	0,3
<i>Proteobacteria (Alpha)</i>	<i>Devosia</i>	0,1	0,0
<i>Proteobacteria (Alpha)</i>	<i>Mesorhizobium</i>	0,1	0,0
<i>Proteobacteria (Alpha)</i>	<i>Agrobacterium</i>	0,1	0,0
<i>Proteobacteria (Alpha)</i>	<i>Hyphomonas</i>	3,3	2,2
<i>Proteobacteria (Alpha)</i>	<i>Rhodobacter</i>	1,2	0,3
<i>Proteobacteria (Alpha)</i>	<i>Kaistobacter</i>	0,1	0,0
<i>Proteobacteria (Alpha)</i>	<i>Sphingobium</i>	1,8	0,0
<i>Proteobacteria (Alpha)</i>	<i>Sphingomonas</i>	0,2	0,4
<i>Proteobacteria (Alpha)</i>	<i>Sphingopyxis</i>	0,8	0,9
<i>Proteobacteria (Beta)</i>	<i>Delftia</i>	0,1	0,2
<i>Proteobacteria (Beta)</i>	<i>Hydrogenophaga</i>	0,3	0,1
<i>Proteobacteria (Beta)</i>	<i>Limnohabitans</i>	0,1	1,9
<i>Proteobacteria (Beta)</i>	<i>Methylibium</i>	0,1	0,0
<i>Proteobacteria (Beta)</i>	<i>Cupriavidus</i>	0,1	0,2
<i>Proteobacteria (Delta)</i>	<i>Bdellovibrio</i>	0,3	0,1
<i>Proteobacteria (Delta)</i>	<i>Plesiocystis</i>	0,5	0,1
<i>Proteobacteria (Gamma)</i>	<i>Rheinheimera</i>	0,0	0,1
<i>Proteobacteria (Gamma)</i>	<i>Legionella</i>	0,5	0,1
<i>Proteobacteria (Gamma)</i>	<i>Tatlockia</i>	0,2	0,0
<i>Proteobacteria (Gamma)</i>	<i>Pseudomonas</i>	0,7	37,4
<i>Proteobacteria (Gamma)</i>	<i>Aquimonas</i>	0,7	0,3
<i>Proteobacteria (Gamma)</i>	<i>Pseudoxanthomonas</i>	0,1	0,0

<i>Spirochaetes</i>	<i>Turneriella</i>	0,5	0,1
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Opitutus</i>	0,8	0,8
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Prostheco bacter</i>	0,1	0,1

Como se puede apreciar en la Figura 5.21.A, la principal diferencia entre las columnas control e inoculada estuvo dada por la cantidad de *Pseudomonas*; 0,7 % y 37,7 %, respectivamente. Este género dominó ampliamente la columna inoculada. En la Figura 5.21.B se excluyó género *Pseudomonas* del análisis a fin de comparar las demás comunidades bacterianas de menor abundancia. Se observó claramente que la inoculación condujo a algunos cambios notables en la población bacteriana resultante.

También se observó una dominancia significativa de los géneros *Terracoccus*, *Exiguobacterium* y *Limnohabitans* en la columna inoculada con MOB-181 (Figura 5.21.B y Tabla 5.9.). Por otro lado, se observó una disminución de la población de los géneros *Nitrospira*, *Planctomyces* *Sphingobium* *Rhodobacter* y *Mycobacterium* en la columna inoculada respecto de la columna control (Figura 5.21.B y Tabla 5.9.).

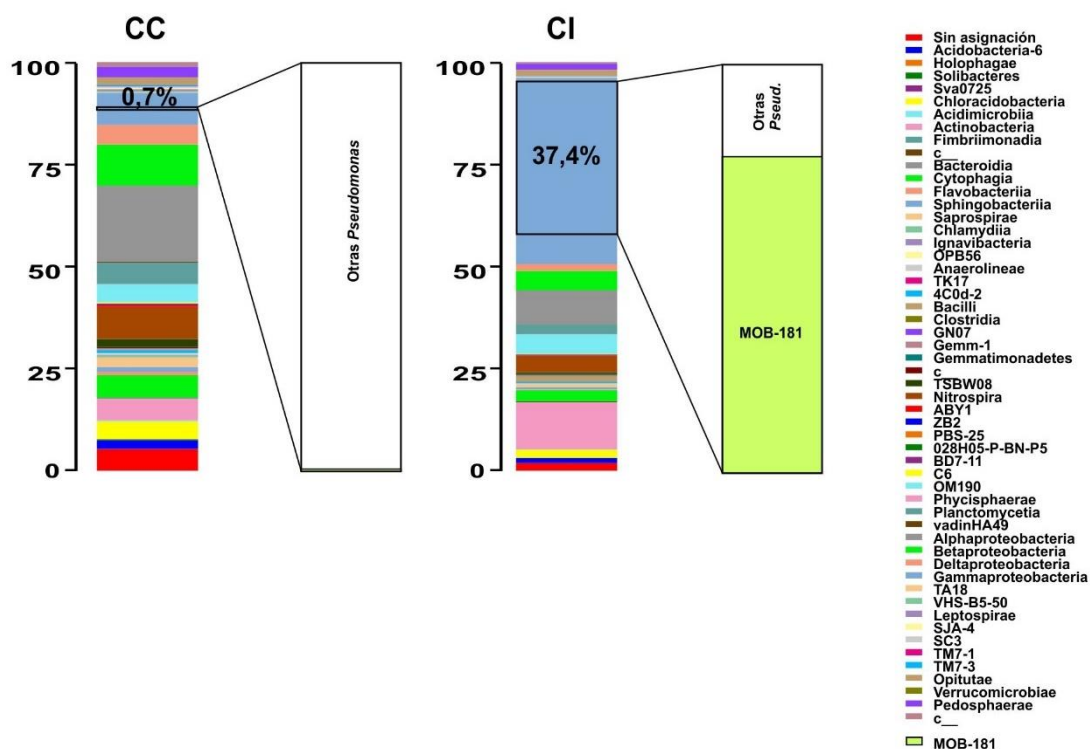


**Figura 5.21. Diferencias en abundancias relativas a nivel de género de las comunidades bacterianas en las columnas control e inoculada al finalizar el ensayo de remoción de Mn(II) del segundo período.**

Se realizaron dos figuras, una que incluye a las *Pseudomonas* (Figura 5.16.A) y otra que excluye a las *Pseudomonas* de la comparación (Figura 5.16.B).

En la figura 5.22. se representa el porcentaje de *Pseudomonas* que corresponden dentro de la categoría de las *GammaProteobacterias*. Además, se incluyó el análisis que se realizó con la secuencia de MOB-181 para calcular su abundancia dentro de la columna. Se determinó que las secuencias idénticas a la *Pseudomonas* MOB-181 representaba el 77,76 % de las *Pseudomonas* totales

en la columna inoculada, lo cual fue significativamente más alto que en la columna control (0,097 %).



**Figura 5.22. Abundancias de OTUs dominantes y proporción de *Pseudomonas* en las columnas inoculadas (I) y control (C).**

Gráfico de barras, basado en los OTUs bacterianos más abundantes detectados en las columnas control (CC) e inoculada (CI). Se muestra representativamente con un cuadro las abundancias del género *Pseudomonas* dentro del grupo de las Gammaproteobacterias. Asimismo, se indica la proporción del total de *Pseudomonas* que corresponde a MOB-181.

## 5.4 Discusión

La bioaumentación es una estrategia que se ha estudiado y aplicado de manera intensiva para el tratamiento de aguas residuales (Guo *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2015), suelos (Tribedi y Sil, 2013) y sedimentos (Ahn *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2015) con el objetivo de resolver algunos problemas prácticos (por ejemplo, mejorar el catabolismo de compuestos orgánicos refractarios) y aumentar la eficiencia de remoción de contaminantes (Herrero y Stuckey, 2015). Sin embargo, su utilización en el tratamiento de agua potable es menos común, debido a la menor cantidad de nutrientes presentes en el influente, el sometimiento de las bacterias a lavados, y debido a que en los sistemas de tratamientos de aguas los roles microbianos no suelen estar muy bien definidos (Bai *et al.*, 2016). El grupo de Benner y colaboradores (Benner *et al.*, 2013) han



propuesto en una revisión que la bioaumentación para el tratamiento de aguas es "una potencial alternativa, sostenible y rentable, a los procesos de tratamiento existentes". Asimismo, se han utilizado estrategias de bioaumentación en filtros de arena para mejorar con éxito la eliminación de 2,6-diclorobenzamida (Albers *et al.*, 2015b) y estrógenos (Haig *et al.*, 2016) presentes en aguas.

En el Capítulo tres se describió la identificación y caracterización de comunidades de MOB, obtenidas a partir de muestras de pre-filtros y filtros de plantas de tratamiento de agua que remueven eficientemente el Mn(II). Se determinó que algunos de estos aislados tendrían la capacidad de colonizar estos nichos, y que podrían así brindar una oportunidad para desarrollar un inóculo especializado que podría explotarse mediante bioaumentación. Sin embargo, a pesar de que los microorganismos seleccionados por este tipo de estrategias pueden ser prometedores para ser utilizados como inoculantes, el éxito del proceso de remoción dependerá de muchos factores, siendo los ambientales uno de los determinantes de la actividad biológica de los microorganismos inoculados. A fin de evaluar la funcionalidad de estos aislados en la optimización de la remoción de Mn(II) de aguas subterráneas naturales, que contienen altas concentraciones de Mn(II), se diseñó un método de bioaumentación a escala de laboratorio. Específicamente, se inmovilizó a la MOB *Pseudomonas* sp. MOB-181 mediante adsorción a la arena de los filtros y se comparó la eficiencia de la eliminación del Mn(II) entre un filtro inoculado con MOB-181 y otro filtro no inoculado (control).

Además del procedimiento de selección de cepas, se consideró que la forma de introducir y mantener el inóculo y sus actividades dentro del filtro son muy importantes. La inmovilización de las células a la superficie de la arena de los filtros fue la metodología elegida. La aplicación de células inmovilizadas para estudiar procesos microbiológicos es una de las principales tendencias de la biotecnología moderna. Las ventajas económicas y metodológicas de esta técnica son principalmente el incremento de la concentración celular, prevención del lavado de las células expuestas a altas velocidades de flujo, y actividades metabólicas prolongadas, entre otras (el-Naggar *et al.*, 2003). En nuestro trabajo, la bioaumentación se estructuró en dos pasos: (i) inmovilización de MOB en la arena de los filtros, (ii) activación del metabolismo de oxidación de Mn(II) en los microorganismos adsorbidos en la arena y adaptación a las condiciones

(incubación en H<sub>2</sub>O cruda) a las cuales van a estar expuestas en el ensayo de remoción del metal.

Se realizaron dos ensayos en distintos períodos, cuya principal diferencia fue el registro de temperaturas de los mismos. Además, se utilizó la secuenciación por Illumina del gen 16S ARNr para examinar la diversidad microbiana en los filtros al finalizar el tratamiento y determinar la sobrevida de MOB-181.

Los resultados de la remoción de Mn(II) mostraron que en la columna bioaumentada se aceleró el inicio de la remoción del Mn(II) en los dos períodos estudiados (Figuras 5.8. y 5.16.). Estas diferencias revelan que la inoculación de los filtros con la *Pseudomona* MOB-181 fue la responsable de acelerar los tiempos de remoción de Mn(II) del agua en las dos condiciones ensayadas. Las medidas de pH y O<sub>2</sub> disuelto en el H<sub>2</sub>O fueron estrictamente controladas a lo largo de los ensayos a fin de determinar si estaban dadas las condiciones para el crecimiento bacteriano y la oxidación biológica dentro del sistema de filtros. A pHs muy altos (pH>9) es termodinámicamente favorable la oxidación química del Mn(II) por el O<sub>2</sub> (Luther, 2009), y a pHs más bajos la oxidación de Mn(II) sólo es posible en presencia de MOB que aceleran la reacción. Durante los dos ensayos, los valores de pH no variaron significativamente entre el influente y los efluentes de las dos columnas, siempre en el rango de 8,135<pH<8,47 (Tablas 5.3. y 5.7.). Tal como se describió al inicio de este capítulo (**Sección 5.3.3.1**), los valores de pH del agua influente fueron adecuados tanto para el crecimiento de MOB-181 como para su actividad oxidante de Mn(II). Por esto, es posible especular que en ambos períodos la oxidación de Mn(II) fue mayoritariamente biológica.

La concentración de OD fue controlada en cada sector del sistema debido a la importancia de este parámetro, dado que, al igual que la temperatura, son factores que influyen en la mayoría de los procesos vitales de los organismos así como en variados factores abióticos (Mouchet, 1992). Su importancia en el proceso de oxidación biológica del Mn(II), reside en el hecho que el inoculante no sólo necesita el O<sub>2</sub> para vivir, sino que también la oxidación del Mn(II) es llevada a cabo en un ambiente completamente aerobio, con un contenido de OD superior a 5 mg L<sup>-1</sup> (Gislette y Mouchet, 1997; Mouchet, 1992). Algunos autores han registrado altas remociones de Mn a concentraciones menores de OD, alrededor de 3,5 mg L<sup>-1</sup> (Katsoyiannis y Zouboulis, 2004). Los resultados

obtenidos mostraron que, a lo largo de los ensayos, la OD del agua influente fue adecuada para propiciar el crecimiento bacteriano y similar a la de los sistemas de filtrado de escala real (Pacini *et al.*, 2005). Estos valores fueron de  $8,57 \text{ mg L}^{-1}$  en el invierno y  $7,4 \text{ mg L}^{-1}$  en el verano, coincidiendo con los datos publicados en la literatura que muestran que al aumentar la temperatura, disminuye la cantidad de oxígeno disuelto en el agua (Taylor y Barton, 1992). Asimismo, se puede suponer que estuvieron dadas las condiciones para el desarrollo óptimo del inoculante y de la actividad oxidante de Mn(II).

En los dos períodos de estudio se alcanzó una eficiencia de remoción de Mn(II) del 100 % en las columnas control e inoculada, y, en ambos casos, en la columna inoculada el tiempo en el que se alcanzó esta eficiencia fue más corto (Figuras 5.8. y 5.16.). La diferencia entre ambos períodos estuvo dada principalmente por el tiempo de duración de los ensayos, siendo el verano el período donde se alcanzó la mayor eficiencia en el menor tiempo.

En ambos ensayos se observó que la acumulación de los MnOx comenzaba en la capa superior de la arena durante la remoción del Mn(II) del agua (Figuras 5.9. y 5.17.). Esto sugiere que el modo de flujo del influente (desde la parte superior a la parte inferior de las columnas) permitió a las bacterias presentes cerca de la toma de agua aceptar más nutrientes. De este modo, se podría explicar por qué la proliferación y la oxidación de Mn(II) por parte de las bacterias en la capa superior fueron más rápidas que las de la parte inferior de los biofiltros. La posterior cuantificación de la acumulación de MnOx en las distintas fracciones de la arena permitió determinar en qué zonas del filtro estaba dada la mayor actividad oxidante de Mn(II). Los resultados del primer período (Figura 5.10.) muestran concentraciones de MnOx de  $\sim 350 \text{ } \mu\text{M}$  óxidos  $\text{g}^{-1}$  de arena, mientras que en el segundo período, las concentraciones máximas estuvieron alrededor de  $\sim 750 \text{ } \mu\text{M}$  óxidos  $\text{g}^{-1}$  de arena. Por otro lado, la distribución de los MnOx en la columna inoculada luego del segundo período fue más escalonada a lo largo de la columna, en orden decreciente; mientras que en la columna control se detectó que la actividad estaba localizada en las dos primeras fracciones de arena, abarcando una mayor área respecto del primer período (Figuras 5.10. y 5.18). En base a estas determinaciones se puede observar cómo las altas temperaturas favorecen la actividad oxidante de Mn(II) en los sistemas de filtros biológicos.

Todos los inoculantes son sensibles a la temperatura dado que, a bajas temperaturas, las velocidades de crecimiento bacteriano disminuyen y se retrasa la oxidación de Mn(II) y a temperaturas muy extremas se reduce la carga microbiana de los filtros (Bai *et al.*, 2016). Tal es así que en invierno, por ejemplo, los filtros tienen una significativa reducción de los óxidos de Mn biogénicos debido a la baja actividad bacteriana. En tales casos, los filtros necesitan una mayor concentración de biomasa en los períodos de invierno que en los de verano, siendo necesario el agregado de más inóculo a intervalos regulares para una optimización de la remoción (Herrero y Stuckey, 2015).

Diversos estudios han reportado la dificultad de separar los microorganismos provenientes de un biofilm de su material de soporte, dadas las desventajas y problemas que implica el proceso de sonicación en la viabilidad celular (Perez *et al.*, 2010). Si bien nuestros intentos de cuantificar las MOB heterótrofas cultivables fallaron debido a la poca reproducibilidad de los ensayos, se pudo demostrar la existencia de MOB provenientes de los biofilms de ambos filtros en los dos períodos de estudio al finalizar los ensayos de remoción de Mn(II) (Figuras 5.11. y 5.19.), sugiriendo que la remoción en los dos sistemas de filtros fue mediada biológicamente.

Hay indicios que indican el establecimiento de MOB-181 al final del ensayo en las columnas inoculadas en ambos períodos, tales como el análisis de los datos de secuenciación por Illumina (Figuras 5.14 y 5.22.). Sin embargo, la prevalencia de MOB-181 al finalizar el segundo período fue mucho mayor que al cabo del primer período. Estos resultados sugieren una mejor sobrevivencia y/o adherencia a la arena de la columna de MOB-181 en épocas de temperaturas más altas. Sin embargo, es interesante destacar en este punto que estos estudios se realizaron al finalizar los dos ensayos y surgen dos principales diferencias que dificultan la comparación directa de los resultados obtenidos. La primera razón está asociada a la cantidad de días que duró cada tratamiento, el primero 55 d y el segundo 30 d. En segundo lugar, ambos sistemas estuvieron sometidos a diferentes condiciones, entre las cuales se destaca la variación de temperaturas. La razón de las diferencias observadas en los resultados anteriores podría ser que las bajas temperaturas registradas durante el primer período pudieron resultar letales para algunas bacterias, incluida MOB-181 y por eso el inoculante se vio disminuido al final del ensayo en comparación con la

abundancia detectada en el segundo período. De hecho, es importante notar que durante los días 26 a 29 del primer período se registraron los picos mínimos de temperaturas que estuvieron entre -3 y 0 °C. Por otro lado, la menor abundancia puede deberse a que MOB-181 se lavó más fácilmente en aguas con menor temperatura. Por lo tanto, el efecto de la bioaumentación al finalizar los ensayos pudo haber estado determinado tanto por las condiciones del ambiente como por la cepa inoculada.

Los resultados de secuenciación por Illumina del gen 16S ARNr obtenidos durante el primer período también permitieron determinar que, al finalizar el ensayo, tanto la columna inoculada con MOB-181 como la control poseían una diversidad bacteriana similar, sugiriendo que la presencia de MOB-181 en la columna inoculada no afectó la colonización del filtro por parte de las bacterias presentes en el agua (Figura 5.12.). El grupo de Bai y colaboradores, hipotetizan que una posible razón para explicar la observación de iguales diversidades entre sistemas de filtros se relaciona con el hecho de que las bacterias en el ambiente oligotrófico (agua subterránea) son tolerantes al estrés por inanición. Esto es de gran importancia en lo que respecta a la bioaumentación, ya que la biodegradación de una amplia gama de contaminantes depende de las bacterias indígenas (Bai *et al.*, 2016).

Por otro lado, la mayoría de los estudios de bioaumentación en aguas residuales han revelado que las cepas inoculadas pueden alterar significativamente la composición de la comunidad microbiana indígena (Bai *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2015). Esto es consistente con lo que ocurrió en el segundo período, donde la diversidad bacteriana se vio notablemente disminuida debido a la gran prevalencia de MOB-181 en la columna inoculada (Figura 5.20.). En la columna control se observó una buena eficiencia de remoción del Mn(II) de aguas y pudo haberse debido al hecho que una cantidad considerable de especies co-construyeron un ecosistema complejo que, si bien no funcionó muy bien a tiempos cortos para remover el Mn(II), una vez establecido logró remover el Mn(II) total en tiempos similares a los de la comuna inoculada con MOB-181. Se ha señalado que "cuanto más complejo es el ecosistema de un reactor, más estable y resistente será" (Zein *et al.*, 2004). Por lo tanto, en el segundo período, la bioaumentación con la cepa MOB-181 afectó la estructura de la comunidad microbiana y la dinámica de los filtros.

En los resultados de las abundancias del primer período, la proporción final de MOB-181 no permite concluir tan claramente que las diferencias observadas en la remoción de Mn(II) se deban estrictamente a la presencia del inoculante. Sin embargo, la proporción de *Pseudomonas* en la columna inoculada es mayor (5,5 %) respecto de la control (2,3 %), y se determinó que una gran proporción corresponde al inoculante MOB-181 (Figura 5.12.). Es posible que las bajas temperaturas hayan afectado la sobrevida y actividad del mismo pero que con esta mínima diferencia sea suficiente para explicar los cambios observados a lo largo del ensayo. Las bajas temperaturas también explicarían el retraso del inicio de la remoción respecto de los tiempos registrados en el segundo período (Figuras 5.8. y 5.16.). Con los resultados obtenidos, también es posible especular que durante el primer período el inoculante se estableció adecuadamente pero que por algún motivo, ya sea un descenso brusco de la temperatura durante el ensayo o dado los extensos tiempos de duración del experimento que impidieron su sobrevida al finalizar. Un resultado que apoya esta hipótesis es la cantidad total de MnOx acumulados en la columna inoculada al final del ensayo, los cuales fueron mucho mayores que en la columna control (Figura 5.10.). Aunque faltan datos para asegurar, se puede presuponer que las diferencias observadas en cuanto a la remoción del Mn(II) estuvieron dadas por la acción del inoculante MOB-181 durante los primeros tiempos.

En el segundo período de estudio, el inoculante fue capaz de establecerse adecuadamente, de sobrevivir a las condiciones presentes en el agua dentro de los tiempos experimentales ensayados y los cambios observados en la remoción en este período pueden atribuirse a su presencia. En conjunto, estos resultados sugieren que las altas temperaturas son más beneficiosas tanto para la aceleración del inicio de la remoción, como para la sobrevida del inoculante y la competencia con las bacterias indígenas del agua, y que es posible que la aplicación a escala real de estos ensayos requiera de re-inoculaciones en los períodos de baja temperatura para asegurar el adecuado funcionamiento de los sistemas de filtros.

Finalmente, vale la pena mencionar que las Proteobacteria fueron el filo dominante en los sistemas control e inoculados durante los dos períodos evaluados, lo que indica que los miembros de este grupo desempeñaron funciones importantes en la eliminación del Mn(II) y que dicho metal era menos

tóxico para ellas. Estos resultados coinciden con los obtenidos a partir del estudio de las comunidades microbianas presentes en las plantas de VO y LT presentadas en el Capítulo tres (Figura 3.3. y Tabla 3.4.). Un total de 62 géneros bacterianos diferentes fueron identificados en ambos períodos de los cuales 20 géneros aparecieron en ambos ensayos. Un total de 19 géneros fueron identificados únicamente en el primer período y 23 géneros fueron propios del segundo período de estudio, Tabla 5.10.

**Tabla 5.10. Géneros bacterianos identificados en las columnas control (CC) e inoculada (CI) al final los ensayos de remoción de Mn(II) del primer y segundo período de estudio.** Los géneros que fueron identificados en ambos períodos se muestran en una misma fila y los géneros identificados en cada período se encuentran en diferentes columnas. En negrita se indican los géneros previamente reportados como MOB en la literatura.

<b>Géneros Periodo</b>	<b>Primer</b>	<b>% CC</b>	<b>% CI</b>	<b>Géneros Periodo</b>	<b>Segundo</b>	<b>% CC</b>	<b>% CI</b>
<i>Corynebacterium</i>		4,9	0,9				
<b><i>Microbacterium</i></b>		0,0	1,7				
<i>Halomonas</i>		0,0	0,3				
<i>Enhydrobacter</i>		0,3	0,7				
<b><i>Acinetobacter</i></b>		2,4	1,4				
<i>Nevskia</i>		0,3	1,4				
<i>Fluviicola</i>		0,0	0,1				
<b><i>Flavobacterium</i></b>		0,0	0,1				
<i>Elizabethkingia</i>		1,0	0,3				
<i>Eubacterium</i>		0,2	0,0				
<i>Syntrophomonas</i>		0,1	0,0				
<i>Methylobacterium</i>		0,7	0,2				
<i>Limnobacter</i>		0,7	3,5				
<i>Methyloversatilis</i>		0,1	0,4				
<i>Sulfurimonas</i>		0,1	0,0				
<i>Cellvibrio</i>		0,0	0,1				
<i>Arenimonas</i>		0,2	0,9				
<i>Sphaerochaeta</i>		0,1	0,0				
<i>Kosmotoga</i>		0,2	0,1				
<i>Mycobacterium</i>		9,4	4,2	<i>Mycobacterium</i>		1,9	0,6
<i>Nocardia</i>		8,6	1,8	<i>Nocardia</i>		3,2	3,3
<i>Cytophaga</i>		0,1	0,0	<i>Cytophaga</i>		0,1	0,0
<b><i>Bacillus</i></b>		3,5	1,3	<b><i>Bacillus</i></b>		0,3	0,4
<i>Nitrospira</i>		1,6	1,1	<i>Nitrospira</i>		7,8	4,0
<i>Gemmata</i>		3,6	2,4	<i>Gemmata</i>		1,5	1,3
<i>Planctomyces</i>		2,0	3,5	<i>Planctomyces</i>		3,1	0,8
<i>Phenylobacterium</i>		0,9	0,8	<i>Phenylobacterium</i>		0,4	0,3
<i>Devosia</i>		0,0	0,1	<i>Devosia</i>		0,1	0,0

<b>Rhodobacter</b>	0,6	0,6	<b>Rhodobacter</b>	1,2	0,3
<i>Hyphomonas</i>	4,1	3,8	<i>Hyphomonas</i>	3,3	2,2
<i>Sphingobium</i>	0,1	0,1	<i>Sphingobium</i>	1,8	0,0
<b>Sphingomonas</b>	0,0	1,2	<b>Sphingomonas</b>	0,2	0,4
<b>Hydrogenophaga</b>	0,5	0,9	<b>Hydrogenophaga</b>	0,3	0,1
<b>Sphingopyxis</b>	0,9	1,5	<b>Sphingopyxis</b>	0,8	0,9
<i>Rheinheimera</i>	0,2	0,3	<i>Rheinheimera</i>	0,0	0,1
<b>Legionella</b>	0,1	0,0	<b>Legionella</b>	0,5	0,1
<b>Pseudomonas</b>	2,3	5,5	<b>Pseudomonas</b>	0,7	37,4
<i>Opitutus</i>	0,1	0,0	<i>Opitutus</i>	0,8	0,8
<i>Prostheco bacter</i>	0,7	0,5	<i>Prostheco bacter</i>	0,1	0,1
			<i>Terracoccus</i>	0,0	7,4
			<b>Rhodococcus</b>	0,2	0,1
			<i>Fimbriimonas</i>	0,2	0,0
			<i>Runella</i>	0,2	0,0
			<i>Crocinitomix</i>	0,5	0,0
			<i>Chryseobacterium</i>	0,0	0,2
			<i>Sediminibacterium</i>	0,2	0,1
			<i>Exiguobacterium</i>	0,0	1,0
			<i>Gemmatimonas</i>	0,0	0,1
			<i>Caulobacter</i>	0,2	0,2
			<i>Mesorhizobium</i>	0,1	0,0
			<i>Agrobacterium</i>	0,1	0,0
			<i>Kaistobacter</i>	0,1	0,0
			<i>Delftia</i>	0,1	0,2
			<i>Limnohabitans</i>	0,1	1,9
			<i>Methylibium</i>	0,1	0,0
			<b>Cupriavidus</b>	0,1	0,2
			<i>Bdellovibrio</i>	0,3	0,1
			<i>Plesiocystis</i>	0,5	0,1
			<i>Tatlockia</i>	0,2	0,0
			<i>Aquimonas</i>	0,7	0,3
			<i>Pseudoxanthomonas</i>	0,1	0,0
			<i>Turneriella</i>	0,5	0,1

Algunos géneros encontrados en ambos períodos fueron previamente reportados en la literatura con capacidad de oxidación de Mn(II), tales como *Pseudomonas* (Cerrato et al., 2010; Geszvain et al., 2016), *Hydrogenophaga* (Marcus et al., 2017), *Acinetobacter* (Beukes y Schmidt, 2012), *Bacillus* (Wang et al., 2010), *Sphingomonas* (Francis et al., 2001), *Flavobacterium* (Akob et al., 2014), *Sphingopyxis* (Liang et al., 2017), *Rhodobacter* (Templeton et al., 2005), *Cupriavidus*, *Rhodococcus* (Yang et al., 2013), *Legionella* (Piazza et al., 2019), *Microbacterium* (Yang et al., 2013). Estos géneros bacterianos, señalados en la Tabla 5.10. en negrita, podrían ser los responsables de la remoción de Mn(II) en



la columna control mediada por bacterias indígenas y, su presencia en la columna inoculada, podría estar contribuyendo a la actividad de MOB-181.

Los resultados muestran además que las abundancias del género *Pseudomonas* durante el segundo período fueron significativamente diferentes entre las columnas control e inoculada y ningún otro género mostró tal diferencia (Tabla 5.10.).

A partir de estos resultados se desprenden varias conclusiones importantes. La primera tiene que ver con el hecho de que el comportamiento de la cepa inoculada y de las bacterias indígenas en los sistemas de filtros depende de la temperatura. Tal como se mencionó anteriormente, la aplicación exitosa de la tecnología de bioaumentación para el tratamiento de aguas con altos contenidos de Mn(II) depende de las cepas microbianas apropiadas y de su subsiguiente supervivencia y actividad una vez liberadas en las unidades de tratamiento. Por otra parte, en estos casos donde la población de bacterias autóctonas tiene la capacidad de optimizar el tratamiento, es deseable que las cepas microbianas introducidas por bioaumentación “refuercen” esta actividad pero que no superen a los demás microorganismos oxidantes autóctonos debido a la competencia por espacio y nutrientes (Bai *et al.*, 2009). Sin embargo, no podemos dejar de mencionar que este tipo de sistemas falla cuando la comunidad microbiana indígena es incapaz de sobrevivir y/o oxidar el Mn(II) presente en el agua. Para tales sistemas, donde si o si se necesitan desarrollar tecnologías de bioaumentación adecuadas, es recomendable que ocurra lo que se describió en el segundo período de manera de garantizar el éxito de la aplicación. Es decir, asegurarse de que la bacteria inoculada compita eficientemente con las bacterias indígenas inadecuadas.

Los resultados de esta parte del estudio muestran la factibilidad del uso de una técnica de inoculación de filtros de arena para tratamiento de aguas subterráneas que contienen Mn(II) y la verificación experimental de la hipótesis de que la inoculación mediante la inmovilización de MOB-181 en la arena acelera la formación de óxidos de Mn.

Como se mencionó anteriormente, se decidió trabajar con una concentración de Mn(II) igual a  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , lo que equivale a aproximadamente 5 veces el valor promedio presente en muchas de las aguas a tratar ( $\sim 0,2 \text{ mg L}^{-1}$ ) y a 20 veces el valor permitido por la ley ( $< 0,05 \text{ mg L}^{-1}$ ). Estos parámetros

destacan la importancia de los resultados obtenidos, donde no sólo se saturó el agua de Mn(II) sino que además se saturó la capacidad de la columna y de todos modos se llegó a una remoción del 100 % en tiempos razonables. En un agua que naturalmente contiene  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ , se necesitaría alcanzar un 75 % de remoción para llegar a la concentración permitida de  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ . Si se pudieran extrapolar los resultados obtenidos de las eficiencias en los dos períodos ensayados, se podría especular que en un ensayo de invierno se necesitarían 32 d para lograrlo y en verano bastaría con 19 d de operación continua del sistema bioaumentado con MOB-181.

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo indican que la inoculación con MOB-181, podría ser utilizada en filtros de arena para el tratamiento de aguas reales con alto contenido de Mn(II).

## 6 Conclusiones

La filtración biológica se utiliza para eliminar los metales presentes en el agua subterránea, ya que es una tecnología rentable que minimiza el uso de oxidantes químicos. Sin embargo, en estos procesos biológicos, una eliminación óptima de Mn(II) sólo se puede lograr en sistemas que contengan comunidades microbianas apropiadas. En este trabajo, para caracterizar nuevas bacterias con estas propiedades, se caracterizaron las comunidades bacterianas y MOB cultivables que residen en dos plantas de tratamiento biológico de aguas subterráneas.

Mediante la secuenciación Illumina del gen 16S ARNr bacteriano, se caracterizó el microbioma total de dos plantas de tratamiento biológico de aguas de la provincia de Santa Fe, que actualmente funcionan eficientemente removiendo Mn. Los resultados obtenidos permitieron diseñar estrategias de selección y aislamiento de MOB en medios de cultivo específicos. Se obtuvieron 202 aislados bacterianos putativos oxidantes de Mn, los cuales fueron identificados molecularmente. Se determinó que un gran número de MOB eran previamente conocidos y varios de los aislamientos caracterizados nunca antes se habían informado como MOB. Un total de 23 MOB fueron caracterizadas en función de su capacidad oxidante de Mn y formadora de biofilms. Cinco de tales MOB fueron clasificadas como las mejores. Considerando como objetivo final el uso de estas cepas en plantas de tratamientos de aguas a fin de optimizar la remoción biológica de Mn, estas cinco MOB fueron estudiadas luego en función de su capacidad de oxidación de Mn frente a diferentes condiciones: cambios de temperaturas y presencia de metales inhibidores. La cepa MOB-181, perteneciente al género *Pseudomonas*, resultó ser la bacteria más versátil, con capacidad de oxidar en todas las condiciones ensayadas. Esta MOB además fue capaz de oxidar Mn(II) de un agua subterránea natural cuando estuvo inmovilizada sobre arena y no inhibió el crecimiento de otras MOB cuando se crecieron juntas.

La producción de EPS que permiten la adhesión a las superficies y que posteriormente conduce a la formación de biofilms es una característica que se encuentra con frecuencia en los sistemas de tratamiento de aguas en presencia

de metales. El desarrollo del biofilm es importante para que las MOB queden retenidas sobre la arena de los filtros para llevar adelante su función y resistan ser lavadas del sistema. En el presente estudio, se profundizó el conocimiento sobre la producción de EPS y de formación de biofilm en MOB-181, previamente caracterizada. Se determinó, a través del estudio de morfología de macrocolonia en agar, que MOB-181 produce EPS agregativos y en mayor cantidad en presencia de Mn. Además, se aplicó el enfoque de microseccionamiento/microscopía para el análisis simultáneo de los dos procesos de interés en el estudio de MOB para aplicaciones biotecnológicas, la formación de biofilms y la oxidación de Mn(II). Se determinó la localización de la producción de EPS dentro del biofilm *in situ* y la localización de las áreas específicas en el interior del biofilm de células que llevan a cabo la oxidación del Mn(II). Mediante el modelo de biofilm en macrocolonia se pudo visualizar a los biofilms de MOB como verdaderos sistemas biológicos complejos desde el punto de vista estructural y dinámico. Los resultados sugieren que la oxidación del Mn(II) ocurre antes y es independiente de la secreción de EPS en MOB-181. Por otro lado, se determinó que la oxidación del Mn *in situ* en el biofilm es muy diferente entre bacterias que muestran distintas capacidades de oxidación.

Por último, se construyó un sistema a escala de laboratorio para evaluar la funcionalidad de un inóculo con MOB-181 en un ensayo de bioaumentación de filtros y se estudió su efecto en la remoción de Mn(II) de aguas subterráneas. Se analizó la influencia de la temperatura en estos sistemas, realizando dos ensayos, uno en invierno y otro en verano. En ambos períodos se alcanzaron eficiencias de eliminación de Mn del 100 % y la bioaumentación con MOB-181 aceleró el tiempo de inicio de la remoción del metal. Por otro lado, en verano se alcanzó la máxima eficiencia en tiempos mucho más cortos que en invierno. Se demostró la existencia de distintas MOB al finalizar los dos ensayos y se corroboró la prevalencia de MOB-181, siendo el verano el período de mayor sobrevida de esta bacteria. Finalmente, se determinó que en invierno, la presencia de MOB-181 no afecta la diversidad bacteriana de los filtros pero que en verano, MOB-181 compete de manera muy visible con las bacterias indígenas del agua influente. En conjunto, los resultados obtenidos indicaron que la

inoculación con MOB-181, podría ser utilizada en filtros de arena para el tratamiento de aguas reales con alto contenido de Mn(II)

En general, este trabajo contribuyó al conocimiento de las comunidades bacterianas presentes en las plantas de tratamiento biológico de aguas y ayudará a la optimización de la eliminación de Mn de las aguas subterráneas.

## 7 Resumen

La presencia de Mn en aguas subterráneas para consumo humano causa problemas de orden estético y de aceptabilidad, organolépticos, operativos y sanitarios. Los métodos empleados para la remoción de Mn en el agua subterránea se pueden clasificar en: físico-químicos y biológicos. En estos últimos, el Mn contenido en el agua es oxidado y precipitado con la ayuda de bacterias ambientales que suelen aparecer en forma natural en las aguas subterráneas que contienen Mn. Sin embargo, en estos procesos se alcanza una óptima remoción de Mn únicamente cuando los sistemas contienen comunidades bacteriana apropiadas, es decir, bacterias oxidantes de Mn y formadoras de biofilm.

En este trabajo, se evaluaron los microbiomas de dos plantas de tratamiento biológico de aguas subterráneas que actualmente eliminan Mn(II) con alta eficiencia. Por otro lado, se cultivó un gran número de MOB conocidos y varios aislamientos que nunca antes se habían informado como MOB. La cepa MOB-181 del género *Pseudomonas*, se destacó de las demás por mostrar características de interés. La misma estuvo presente en el sistema de filtración de LT representando alrededor del 4 % del total de las *Pseudomonas* y pudo cultivarse con facilidad en el laboratorio. Asimismo, demostró buena capacidad de oxidación de Mn(II) en diferentes medios de crecimiento analizados; a diferentes temperaturas; y en presencia de metales inhibidores como el Fe y el propio Mn en altas concentraciones. Resultó ser una excelente formadora de biofilms y pudo oxidar Mn(II) presente en agua cruda mientras estuvo inmovilizada sobre arena. El estudio del rendimiento de la oxidación de Mn(II) de diferentes MOB aisladas en este trabajo permitió postular a MOB-181 como el mejor candidato con potencial para el desarrollo de un inóculo bacteriano aplicable para mejorar el proceso de eliminación de Mn(II) de aguas subterráneas.

La oxidación de Mn y la formación de biofilms son dos características deseables para la elección de cepas con potencial uso en los procesos de remoción de Mn de aguas. A fin de determinar si estos dos procesos están relacionados en las MOB, se aplicaron ensayos de morfología de macrocolonia en agar y crioseccionamiento/microscopía para tratar de comprender la

oxidación de Mn y la producción de EPS *in situ* en el modelo de biofilm de macrocolonia. Mediante el simple modelo de biofilm de macrocolonia, se pudo visualizar a los biofilms como sistemas biológicos complejos, donde los distintos grupos celulares están influenciados por un montón de factores, resultando en grupos de células diferentes dependiendo del entorno en el cual se encuentran.

Finalmente, se construyó un sistema de filtros a escala laboratorio donde se evaluó la funcionalidad de la inoculación de filtros con MOB-181 en la remoción de Mn del agua. Se demostró que un ensayo de bioaumentación con esta bacteria fue capaz de acelerar el inicio de la remoción de Mn en aguas naturales. Asimismo, se observó que los tiempos requeridos para alcanzar la fase estacionaria de la remoción estaban fuertemente influenciados por las temperaturas, alcanzando más rápido la mayor eficiencia a temperaturas más altas. Estos resultados se utilizarán para optimizar los procesos de remoción de Mn de aguas y para el diseño de mejores tecnologías.

## 8 Referencias

- Adler, J., and Templeton, B. (1967). The effect of environmental conditions on the motility of *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 46, 175-184.
- Aguilar, C., Vlamakis, H., Losick, R., and Kolter, R. (2007). Thinking about *Bacillus subtilis* as a multicellular organism. *Curr Opin Microbiol* 10, 638-643.
- Ahn, Y.B., Liu, F., Fennell, D.E., and Haggblom, M.M. (2008). Biostimulation and bioaugmentation to enhance dechlorination of polychlorinated dibenzo-p-dioxins in contaminated sediments. *FEMS Microbiol Ecol* 66, 271-281.
- Akob, D.M., Bohu, T., Beyer, A., Schaffner, F., Handel, M., Johnson, C.A., Merten, D., Buchel, G., Totsche, K.U., and Kusel, K. (2014). Identification of Mn(II)-oxidizing bacteria from a low-pH contaminated former uranium mine. *Appl Environ Microbiol* 80, 5086-5097.
- Albers, C.N., Ellegaard-Jensen, L., Harder, C.B., Rosendahl, S., Knudsen, B.E., Ekelund, F., and Aamand, J. (2015a). Groundwater chemistry determines the prokaryotic community structure of waterworks sand filters. *Environ Sci Technol* 49, 839-846.
- Albers, C.N., Feld, L., Ellegaard-Jensen, L., and Aamand, J. (2015b). Degradation of trace concentrations of the persistent groundwater pollutant 2,6-dichlorobenzamide (BAM) in bioaugmented rapid sand filters. *Water Res* 83, 61-70.
- Andeer, P.F., Learman, D.R., McIlvin, M., Dunn, J.A., and Hansel, C.M. (2015). Extracellular haem peroxidases mediate Mn(II) oxidation in a marine *Roseobacter* bacterium via superoxide production. *Environ Microbiol* 17, 3925-3936.
- Anderson, C.R., Dick, G.J., Chu, M.L., Cho, J.C., Davis, R.E., Brauer, S.L., and Tebo, B.M. (2009a). *Aurantimonas manganoxydans*, sp. nov. and *Aurantimonas litoralis*, sp. nov.: Mn(II) oxidizing representatives of a globally distributed clade of alpha-Proteobacteria from the order Rhizobiales. *Geomicrobiol J* 26, 189-198.
- Anderson, C.R., Johnson, H.A., Caputo, N., Davis, R.E., Torpey, J.W., and Tebo, B.M. (2009b). Mn(II) oxidation is catalyzed by heme peroxidases in "*Aurantimonas manganoxydans*" strain SI85-9A1 and *Erythrobacter* sp. strain SD-21. *Appl Environ Microbiol* 75, 4130-4138.
- Asquith, E., Evans, C., Dunstan, R.H., Geary, P., and Cole, B. (2018). Distribution, abundance and activity of geosmin and 2-methylisoborneol-producing *Streptomyces* in drinking water reservoirs. *Water Res* 145, 30-38.
- Bai, Y., Chang, Y., Liang, J., Chen, C., and Qu, J. (2016). Treatment of groundwater containing Mn(II), Fe(II), As(III) and Sb(III) by bioaugmented quartz-sand filters. *Water Res* 106, 126-134.
- Bai, Y., Liu, R., Liang, J., and Qu, J. (2013). Integrated metagenomic and physiochemical analyses to evaluate the potential role of microbes in the sand filter of a drinking water treatment system. *PLoS One* 8, e61011.
- Bai, Y., Sun, Q., Sun, R., Wen, D., and Tang, X. (2011). Bioaugmentation and adsorption treatment of coking wastewater containing pyridine and quinoline using zeolite-biological aerated filters. *Environ Sci Technol* 45, 1940-1948.
- Bai, Y., Sun, Q., Zhao, C., Wen, D., and Tang, X. (2009). Simultaneous biodegradation of pyridine and quinoline by two mixed bacterial strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 82, 963-973.
- Benner, J., Helbling, D.E., Kohler, H.P., Wittebol, J., Kaiser, E., Prasse, C., Ternes, T.A., Albers, C.N., Aamand, J., Horemans, B., *et al.* (2013). Is biological treatment a viable alternative for micropollutant removal in drinking water treatment processes? *Water Res* 47, 5955-5976.
- Berridge, M.V., Herst, P.M., and Tan, A.S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 11, 127-152.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 62, 293-300.



- Beukes, L.S., and Schmidt, S. (2012). Isolation and characterization of a manganese-oxidizing bacterium from a biofiltration system for the treatment of borehole water in KwaZulu-Natal (South Africa). *Eng Life Sci* 2012, 1–9
- Boogerd, F.C., and de Vrind, J.P. (1987). Manganese oxidation by *Leptothrix discophora*. *J Bacteriol* 169, 489-494.
- Bourguine, F.P., Gennery, M., Chapman, J.I., Kerai, H., Green, J.G., Rap, R.J., Ellis, S., and Gaumard, C. (1994). Biological processes at saints hill water treatment plant, Kent. *Journal of the Institution of Water and Environmental Management*, N°8 August.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Burger, M.S., Mercer, S.S., Shupe, G.D., and Gagnon, G.A. (2008). Manganese removal during bench-scale biofiltration. *Water Res* 42, 4733-4742.
- Burland, T.G. (2000). DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Methods Mol Biol* 132, 71-91.
- Byrd, M.S., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Lu, H., Sprinkle, A.B., Richardson, S.H., Ma, L., Ralston, B., Parsek, M.R., Anderson, E.M., *et al.* (2009). Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Mol Microbiol* 73, 622-638.
- Cameron, I., Bourguine, F. (1998). *Biological Iron and Manganese Removal from Drinking Water*. New Frontier, United Kingdom.
- Cerrato, J.M., Falkinham, J.O., 3rd, Dietrich, A.M., Knocke, W.R., McKinney, C.W., and Pruden, A. (2010). Manganese-oxidizing and -reducing microorganisms isolated from biofilms in chlorinated drinking water systems. *Water Res* 44, 3935-3945.
- Chang, W.S., van de Mortel, M., Nielsen, L., Nino de Guzman, G., Li, X., and Halverson, L.J. (2007). Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. *J Bacteriol* 189, 8290-8299.
- Chapman, M.R., Robinson, L.S., Pinkner, J.S., Roth, R., Heuser, J., Hammar, M., Normark, S., and Hultgren, S.J. (2002). Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* 295, 851-855.
- Chen, L., Jia, R.B., and Li, L. (2013). Bacterial community of iron tubercles from a drinking water distribution system and its occurrence in stagnant tap water. *Environ Sci Process Impacts* 15, 1332-1340.
- Cheng, Q., Nengzi, L., Bao, L., Huang, Y., Liu, S., Cheng, X., Li, B., and Zhang, J. (2017). Distribution and genetic diversity of microbial populations in the pilot-scale biofilter for simultaneous removal of ammonia, iron and manganese from real groundwater. *Chemosphere* 182, 450-457.
- Christensen, B.B., Sternberg, C., Andersen, J.B., Palmer, R.J., Jr., Nielsen, A.T., Givskov, M., and Molin, S. (1999). Molecular tools for study of biofilm physiology. *Methods Enzymol* 310, 20-42.
- Clarridge, J.E., 3rd (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 17, 840-862.
- Colvin, K.M., Gordon, V.D., Murakami, K., Borlee, B.R., Wozniak, D.J., Wong, G.C., and Parsek, M.R. (2011). The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog* 7, e1001264.
- Corstjens, P.L., de Vrind, J.P., Westbroek, P., and de Vrind-de Jong, E.W. (1992). Enzymatic iron oxidation by *Leptothrix discophora*: identification of an iron-oxidizing protein. *Appl Environ Microbiol* 58, 450-454.
- Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., and Marrie, T.J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 41, 435-464.

- Cruz, I., Bashan, Y., Hernandez-Carmona, G., and de-Bashan, L.E. (2013). Biological deterioration of alginate beads containing immobilized microalgae and bacteria during tertiary wastewater treatment. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 9847-9858.
- Czekalla, C., Mevius, W., and Hanert, H. (1985). Quantitative removal of Fe and Mn by microorganisms in rapid sand filters (in situ investigations). *Water Supply* 3, 111-123.
- Dick, G.J., Torpey, J.W., Beveridge, T.J., and Tebo, B.M. (2008). Direct identification of a bacterial manganese(II) oxidase, the multicopper oxidase MnxG, from spores of several different marine *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol* 74, 1527-1534.
- Dimitrakos Michalakos, G., Martinez Nieva, J., Vayenas, D.V., and Lyberatos, G. (1997). Removal of iron from potable water using a trickling filter. *Water Research* 31, 991-996.
- Dingle, T.C., and Butler-Wu, S.M. (2013). Maldi-tof mass spectrometry for microorganism identification. *Clin Lab Med* 33, 589-609.
- Douterelo, I., Husband, S., and Boxall, J.B. (2014). The bacteriological composition of biomass recovered by flushing an operational drinking water distribution system. *Water Res* 54, 100-114.
- el-Naggar, M.Y., Hassan, M.A., Said, W.Y., and el-Aassar, S.A. (2003). Effect of support materials on antibiotic MSW2000 production by immobilized *Streptomyces violaceus*. *J Gen Appl Microbiol* 49, 235-243.
- Emerson, D., and Ghiorse, W.C. (1992). Isolation, Cultural Maintenance, and Taxonomy of a Sheath-Forming Strain of *Leptothrix discophora* and Characterization of Manganese-Oxidizing Activity Associated with the Sheath. *Appl Environ Microbiol* 58, 4001-4010.
- ENOHSA (1998). Normas para la presentación de proyectos de abastecimiento de agua potable. Ente Nacional de Obras Hídricas y Saneamiento.
- ENRESS (1996). Ente Regulador de Servicios Sanitarios de la Provincia de Santa Fe. Normas de Calidad de Agua Potable. Ley 11220, Título IV- Marco Regulatorio - Anexo A.
- Fleming, E.J., Cetinic, I., Chan, C.S., Whitney King, D., and Emerson, D. (2014). Ecological succession among iron-oxidizing bacteria. *Isme j* 8, 804-815.
- Flemming, H.C., and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8, 623-633.
- Francis, C.A., Casciotti, K.L., and Tebo, B.M. (2002). Localization of Mn(II)-oxidizing activity and the putative multicopper oxidase, MnxG, to the exosporium of the marine *Bacillus* sp. strain SG-1. *Arch Microbiol* 178, 450-456.
- Francis, C.A., Co, E.M., and Tebo, B.M. (2001). Enzymatic manganese(II) oxidation by a marine alpha-proteobacterium. *Appl Environ Microbiol* 67, 4024-4029.
- Francis, C.A., and Tebo, B.M. (2001). cumA multicopper oxidase genes from diverse Mn(II)-oxidizing and non-Mn(II)-oxidizing *Pseudomonas* strains. *Appl Environ Microbiol* 67, 4272-4278.
- Friedman, L., and Kolter, R. (2004a). Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol Microbiol* 51, 675-690.
- Friedman, L., and Kolter, R. (2004b). Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *J Bacteriol* 186, 4457-4465.
- Gallard, H., and von, G.U. (2002). Chlorination of natural organic matter: kinetics of chlorination and of THM formation. *Water Res* 36, 65-74.
- Gariboglio, M. (1996). Biocorrosion diagnostic and microbiologic incrustation in wells. *J Sanitary Environ Eng AIDIS Argentina* 28.
- Gariboglio, M.A., and Smith, S.A. (1993). Corrosión e incrustación microbiológica en sistemas de captación de agua, aspectos teóricos y aplicados. CFI, Serie Investigaciones Aplicadas, Colección Hidrología Subterránea.
- Geszvain, K., Butterfield, C., Davis, R.E., Madison, A.S., Lee, S.W., Parker, D.L., Soldatova, A., Spiro, T.G., Luther, G.W., and Tebo, B.M. (2012). The molecular biogeochemistry of manganese(II) oxidation. *Biochem Soc Trans* 40, 1244-1248.

- Geszvain, K., Smesrud, L., and Tebo, B.M. (2016). Identification of a Third Mn(II) Oxidase Enzyme in *Pseudomonas putida* GB-1. *Appl Environ Microbiol* 82, 3774-3782.
- Geszvain, K., and Tebo, B.M. (2010). Identification of a two-component regulatory pathway essential for Mn(II) oxidation in *Pseudomonas putida* GB-1. *Appl Environ Microbiol* 76, 1224-1231.
- Geszvain, K., Yamaguchi, A., Maybee, J., and Tebo, B.M. (2011). Mn(II) oxidation in *Pseudomonas putida* GB-1 is influenced by flagella synthesis and surface substrate. *Arch Microbiol* 193, 605-614.
- Ghiorse, W.C. (1984). Biology of iron- and manganese-depositing bacteria. *Annu Rev Microbiol* 38, 515-550.
- Gislette, P., and Mouchet, P. (1997). Eliminación del hierro, del manganeso y del amoníaco en las aguas potables, los tratamientos biológicos. Taller Internacional Sobre Hierro y Manganeso (AIDIS) Buenos Aires, Argentina, Noviembre.
- Gorbushina, A.A., and Broughton, W.J. (2009). Microbiology of the atmosphere-rock interface: how biological interactions and physical stresses modulate a sophisticated microbial ecosystem. *Annu Rev Microbiol* 63, 431-450.
- Gottfreund, J., and Schweisfurth, R. (1983). Mikrobiologische Oxidation und Reduktion von Manganspecies. *Fresenius Z. Anal Chem* 316, 634-638.
- Gulay, A., Musovic, S., Albrechtsen, H.J., Al-Soud, W.A., Sorensen, S.J., and Smets, B.F. (2016). Ecological patterns, diversity and core taxa of microbial communities in groundwater-fed rapid gravity filters. *Isme j* 10, 2209-2222.
- Guo, J., Wang, J., Cui, D., Wang, L., Ma, F., Chang, C.C., and Yang, J. (2010). Application of bioaugmentation in the rapid start-up and stable operation of biological processes for municipal wastewater treatment at low temperatures. *Bioresour Technol* 101, 6622-6629.
- Haig, S.J., Gauchotte-Lindsay, C., Collins, G., and Quince, C. (2016). Bioaugmentation Mitigates the Impact of Estrogen on Coliform-Grazing Protozoa in Slow Sand Filters. *Environ Sci Technol* 50, 3101-3110.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., and Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2, 95-108.
- Hamilton, W.A. (2003). Microbially influenced corrosion as a model system for the study of metal microbe interactions: a unifying electron transfer hypothesis. *Biofouling* 19, 65-76.
- Hammar, M.R., Arnqvist, A., Bian, Z., Olsen, A., and Normark, S. (1995). Expression of two csg operons is required for production of fibronectin- and Congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 18, 661-670.
- Hansel, C.M., and Learman, D.R. (2016). *Geomicrobiology of Manganese*, 6th edn (Boca Raton, FL: CRC Press).
- Haussler, S., and Fuqua, C. (2013). Biofilms 2012: new discoveries and significant wrinkles in a dynamic field. *J Bacteriol* 195, 2947-2958.
- Hengge-Aronis, R. (1993). Survival of hunger and stress: the role of rpoS in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell* 72, 165-168.
- Herrero, M., and Stuckey, D.C. (2015). Bioaugmentation and its application in wastewater treatment: A review. *Chemosphere* 140, 119-128.
- Hobley, L., Ostrowski, A., Rao, F.V., Bromley, K.M., Porter, M., Prescott, A.R., MacPhee, C.E., van Aalten, D.M., and Stanley-Wall, N.R. (2013). BslA is a self-assembling bacterial hydrophobin that coats the *Bacillus subtilis* biofilm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 13600-13605.
- Hogardt, M., and Heesemann, J. (2013). Microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* to a chronic pathogen of the cystic fibrosis lung. *Curr Top Microbiol Immunol* 358, 91-118.
- Hope, C.K., and Bott, T.R. (2004). Laboratory modelling of manganese biofiltration using biofilms of *Leptothrix discophora*. *Water Res* 38, 1853-1861.
- Johnson, H.A., and Tebo, B.M. (2008). In vitro studies indicate a quinone is involved in bacterial Mn(II) oxidation. *Arch Microbiol* 189, 59-69.

- Kaprelyants, A.S., and Kell, D.B. (1996). Do bacteria need to communicate with each other for growth? *Trends Microbiol* 4, 237-242.
- Katsoyiannis, I.A., and Zouboulis, A.I. (2004). Biological treatment of Mn(II) and Fe(II) containing groundwater: kinetic considerations and product characterization. *Water Res* 38, 1922-1932.
- Kepkay, P., and Nealson, K.H. (1987). Growth of a manganese oxidizing *Pseudomonas* sp. in continuous culture *Arch Microbiol* 148:6367.
- Klewicki, J.K., and Morgan, J.J. (1999). Dissolution of b-MnOOH particles by ligands: pyrophosphate, ethylenediaminetetraacetate, and citrate. *Geochim Cosmochim Acta* 63, 3017–3024.
- Kostka, J.E., Luther III, G.W., and Nealson, K.H. (1995). Chemical and biological reduction of Mn(III)-pyrophosphate complexes—potential importance of dissolved Mn(III) as an environmental oxidant. *Geochim Cosmochim Acta* 59, 885–894.
- Krumbein, W.E., and Altmann, H.J. (1973). A new method for the detection and enumeration of manganese oxidizing and reducing microorganisms. *Helgoländer wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* 25, 347–356.
- Lange, R., and Hengge-Aronis, R. (1991). Growth phase-regulated expression of *bolA* and morphology of stationary-phase *Escherichia coli* cells are controlled by the novel sigma factor sigma S. *J Bacteriol* 173, 4474-4481.
- Lanson, B., V.A., D., Silvester, E., and Manceau, A. (2000). Structure of H-exchanged hexagonal birnessite and its mechanism of formation from Na-rich monoclinic buserite at low pH. *Am Mineral* 85, 826–838.
- Laue, H., Schenk, A., Li, H., Lambertsen, L., Neu, T.R., Molin, S., and Ullrich, M.S. (2006). Contribution of alginate and levan production to biofilm formation by *Pseudomonas syringae*. *Microbiology* 152, 2909-2918.
- Li, C., Li, Y., Cheng, X., Feng, L., Xi, C., and Zhang, Y. (2013). Immobilization of *Rhodococcus rhodochrous* BX2 (an acetonitrile-degrading bacterium) with biofilm-forming bacteria for wastewater treatment. *Bioresour Technol* 131, 390-396.
- Li, C., Wang, S., Du, X., Cheng, X., Fu, M., Hou, N., and Li, D. (2016). Immobilization of iron- and manganese-oxidizing bacteria with a biofilm-forming bacterium for the effective removal of iron and manganese from groundwater. *Bioresour Technol* 220, 76-84.
- Liang, J., Bai, Y., Men, Y., and Qu, J. (2017). Microbe-microbe interactions trigger Mn(II)-oxidizing gene expression. *Isme j* 11, 67-77.
- Linhardt, P. (1997). Corrosion of metals in natural waters influenced by manganese oxidizing microorganisms. *Biodegrad* 8, 201-210.
- Logsdon, G.S., Kohne, R., Abel, S., and LaBonde, S. (2002). Slow sand filter for small water treatment systems. *J Environ Eng Sci* 1, 339–348.
- Luther, G.W. (2009). The role of one- and two-electron transfer reactions in forming thermodynamically unstable intermediates as barriers in multi-electron redox reactions. *Aquat Geochem* 16, 395–420.
- Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M.R., Bayles, K., and Wozniak, D.J. (2009). Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog* 5, e1000354.
- Mamchenko, A.V., Misochka, I.V., Deshko, I.I., Kiy, N.N., and Gerasimenko, N.G. (2009). Priority areas in the technology of purifying underground waters of iron. *J Wat Chem Technol* 31, 57-77.
- Mann, E.E., and Wozniak, D.J. (2012). *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol Rev* 36, 893-916.
- Marcus, D.N., Pinto, A., Anantharaman, K., Ruberg, S.A., Kramer, E.L., Raskin, L., and Dick, G.J. (2017). Diverse manganese(II)-oxidizing bacteria are prevalent in drinking water systems. *Environ Microbiol Rep* 9, 120-128.
- Marsidi, N., Hasan, H.A., S., R., and Abdullah, S. (2018). A review of biological aerated filters for iron and manganese ions removal in water treatment. *Journal of Water Process Engineering* 23, 1–12.

- Morgan, J.J. (2000). Manganese in natural waters and earth's crust: its availability to organisms. *Met Ions Biol Syst* 37, 1-34.
- Mouchet, P. (1992). From conventional to biological removal of iron and manganese in France. *Journal AWWA April Water Res* 38 1853-1861.
- Mouchet, P. (2000). Procédé, Dispositif et utilisation du procédé pour l'élimination par voie biologique d'éléments métalliques présents à l'état ionisé dans les eaux. PCT – OMPI – WO 00/69779- C02F 3/00-3/04.
- Nealson, K. (2006). The Manganese-Oxidizing Bacteria. *Prokaryotes* 5, 222–231.
- Nitzsche, K.S., Weigold, P., Losekann-Behrens, T., Kappler, A., and Behrens, S. (2015). Microbial community composition of a household sand filter used for arsenic, iron, and manganese removal from groundwater in Vietnam. *Chemosphere* 138, 47-59.
- Nivens, D.E., Ohman, D.E., Williams, J., and Franklin, M.J. (2001). Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. *J Bacteriol* 183, 1047-1057.
- Northup, D.E., Barns, S.M., Yu, L.E., Spilde, M.N., Schelble, R.T., Dano, K.E., Crossey, L.J., Connolly, C.A., Boston, P.J., Natvig, D.O., *et al.* (2003). Diverse microbial communities inhabiting ferromanganese deposits in Lechuguilla and Spider Caves. *Environ Microbiol* 5, 1071-1086.
- O'Toole, G.A., and Kolter, R. (1998a). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30, 295-304.
- O'Toole, G.A., and Kolter, R. (1998b). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 28, 449-461.
- Okazaki, M., Sugita, T., Shimizu, M., Ohode, Y., Iwamoto, K., de Vrind-de Jong, E.W., de Vrind, J.P., and Corstjens, P.L. (1997). Partial purification and characterization of manganese-oxidizing factors of *Pseudomonas fluorescens* GB-1. *Appl Environ Microbiol* 63, 4793-4799.
- Osman, S.F., Fett, W.F., and Fishman, M.L. (1986). Exopolysaccharides of the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J Bacteriol* 166, 66-71.
- Ostrowski, A., Mehert, A., Prescott, A., Kiley, T.B., and Stanley-Wall, N.R. (2011). YuaB functions synergistically with the exopolysaccharide and TasA amyloid fibers to allow biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 193, 4821-4831.
- Pacini, V., Ingallinella, A.M., Vidoni, R., Sanguinetti, G., Fernández, R., and (2014). Transformation of an existing physicochemical plant for iron and manganese removal by the application of biological processes. *J Water Supply* 63, 507–517.
- Pacini, V.A., Maria Ingallinella, A., and Sanguinetti, G. (2005). Removal of iron and manganese using biological roughing up flow filtration technology. *Water Res* 39, 4463-4475.
- Perez, L.M., Alvarez, B.L., Codony, F., Fittipaldi, M., Adrados, B., Penuela, G., and Morato, J. (2010). A new microtitre plate screening method for evaluating the viability of aerobic respiring bacteria in high surface biofilms. *Lett Appl Microbiol* 51, 331-337.
- Piazza, A., Ciano Casalini, L., Pacini, V.A., Sanguinetti, G., Ottado, J., and Gottig, N. (2019). Environmental Bacteria Involved in Manganese(II) Oxidation and Removal From Groundwater. *Frontiers in Microbiology* doi: 10.3389/fmicb.2019.00119.
- Piñero, F., Vazquez, M.P., Bare, P., Rohr, C., Mendizabal, M., and Sciara, M. (2017). Case-control study highlights a different gut microbiome in cirrhotic patients with and without hepatocellular carcinoma. . *bioRxiv* doi: 101101/125575.
- Reichhardt, C., Jacobson, A.N., Maher, M.C., Uang, J., McCrate, O.A., Eckart, M., and Cegelski, L. (2015). Congo Red Interactions with Curli-Producing *E. coli* and Native Curli Amyloid Fibers. *PLoS One* 10, e0140388.
- Remminghorst, U., Hay, I.D., and Rehm, B.H. (2009). Molecular characterization of Alg8, a putative glycosyltransferase, involved in alginate polymerisation. *J Biotechnol* 140, 176-183.
- Rice, R.W., Baid, R.B., and Eaton, A.D. (2017). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd edn (Denver, CO: American Water Works Association).

- Rickard, A.H., Gilbert, P., and Handley, P.S. (2004). Influence of growth environment on coaggregation between freshwater biofilm bacteria. *J Appl Microbiol* 96, 1367-1373.
- Ridge, J.P., Lin, M., Larsen, E.I., Fegan, M., McEwan, A.G., and Sly, L.I. (2007). A multicopper oxidase is essential for manganese oxidation and laccase-like activity in *Pedomicrobium* sp. ACM 3067. *Environ Microbiol* 9, 944-953.
- Rittmann, B.E. (2010). Environmental biotechnology in water and wastewater treatment. *J Environ Eng* 136, 348-353.
- Romero, D., Aguilar, C., Losick, R., and Kolter, R. (2010). Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 2230-2234.
- Romling, U. (2005). Characterization of the *rdar* morphotype, a multicellular behaviour in *Enterobacteriaceae*. *Cell Mol Life Sci* 62, 1234-1246.
- Romling, U., Bian, Z., Hammar, M., Sierralta, W.D., and Normark, S. (1998). Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *J Bacteriol* 180, 722-731.
- Romling, U., Galperin, M.Y., and Gomelsky, M. (2013). Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev* 77, 1-52.
- Sambrook, J., Fritsh, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2° edn (New York).
- Schuett, C., and Ottow, J.C.G. (1977). Mesophilic and psychrophilic manganese-precipitating bacteria in manganese nodules of the Pacific Ocean. *Z Allg Mikrobiol* 17, 611-616.
- Seneviratne, C.J., Wang, Y., Jin, L., Wong, S.S., Herath, T.D., and Samaranayake, L.P. (2012). Unraveling the resistance of microbial biofilms: has proteomics been helpful? *Proteomics* 12, 651-665.
- Seppänen, H. (1988). Biological treatment of ground water in basins with floating filters.- the role of microorganisms in floating filters. *Water Science and Technology* 20, 185-187.
- Serra, D.O., and Hengge, R. (2014). Stress responses go three dimensional - the spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms. *Environ Microbiol* 16, 1455-1471.
- Serra, D.O., and Hengge, R. (2017). Experimental Detection and Visualization of the Extracellular Matrix in Macrocolony Biofilms. *Methods Mol Biol* 1657, 133-145.
- Serra, D.O., Richter, A.M., and Hengge, R. (2013a). Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms. *J Bacteriol* 195, 5540-5554.
- Serra, D.O., Richter, A.M., Klauck, G., Mika, F., and Hengge, R. (2013b). Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. *MBio* 4, e00103-00113.
- Shi, S., Qu, Y., Ma, Q., Zhang, X., Zhou, J., and Ma, F. (2015). Performance and microbial community dynamics in bioaugmented aerated filter reactor treating with coking wastewater. *Bioresour Technol* 190, 159-166.
- Singer, A.C., van der Gast, C.J., and Thompson, I.P. (2005). Perspectives and vision for strain selection in bioaugmentation. *Trends Biotechnol* 23, 74-77.
- Sly, L.I., Hodgkinson, M.C., and Arunpairojana, V. (1990). Deposition of manganese in a drinking water distribution system. *Appl Environ Microbiol* 56, 628-639.
- Sommerfeld, E.O. (1999). Iron and Manganese Removal. *Handbook AWWA* (Denver).
- Spiers, A.J., Kahn, S.G., Bohannon, J., Travisano, M., and Rainey, P.B. (2002). Adaptive divergence in experimental populations of *Pseudomonas fluorescens*. I. Genetic and phenotypic bases of wrinkly spreader fitness. *Genetics* 161, 33-46.
- Stein, L.Y., La Duc, M.T., Grundl, T.J., and Nealson, K.H. (2001). Bacterial and archaeal populations associated with freshwater ferromanganese micronodules and sediments. *Environ Microbiol* 3, 10-18.
- Štembal T., Markis, M., Ribicic N., Briski, F., and Sipos, L. (2005). Removal of ammonia, iron and manganese from groundwaters of northern Croatia-pilot plant studies. *Process Biochemistry* 40, 327-335.
- Stephenson, D., and Stephenson, T. (1992). Bioaugmentation for enhancing biological wastewater treatment. *Biotechnol Adv* 10, 549-559.

- Stewart, P.S., and Franklin, M.J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 6, 199-210.
- Stuet, R.M., Greene, A.C., and Madgwick, J.C. (1996). Microalgal-facilitated bacterial oxidation of manganese. *J Ind Microbiol* 16, 267-273.
- Stumm, W., and Morgan, J.J. (1996 ). *Aquatic Chemistry: Chemical equilibria and rates in natural waters* (New York, USA).
- Su, J., Bao, P., Bai, T., Deng, L., Wu, H., Liu, F., and He, J. (2013). CotA, a multicopper oxidase from *Bacillus pumilus* WH4, exhibits manganese-oxidase activity. *PLoS One* 8, e60573.
- Su, J., Deng, L., Huang, L., Guo, S., Liu, F., and He, J. (2014). Catalytic oxidation of manganese(II) by multicopper oxidase CueO and characterization of the biogenic Mn oxide. *Water Res* 56, 304-313.
- Sunda, W.G., and Kieber, D.J. (1994). Oxidation of humic substances by manganese oxides yields low-molecular-weight organic substrates. *Nature*, 62–64.
- Taylor, B.R., and Barton, B.A. (1992). Temperature and dissolved oxygen criteria for Alberta fishes in flowing waters. *Environmental Management Associates for Fish and Wildlife Division, Alberta Environmental Protection Edmonton, AB* 72 pp.
- Tebo, B.M. (1983). The ecology and ultrastructure of marine manganese-oxidizing bacteria. . In Ph.D. Thesis, Univ. of California, San Diego. San Diego.
- Tebo, B.M., Bargar, J.R., Clement, B.G., Dick, G.J., Murray, K.J., Parker, D.L., Verity, R., and Webb, S.M. (2004). Biogenicmanganese oxides: Properties and Mechanisms of Formation. *Annu Rev Earth Planet Sci* 32, 287–328.
- Tebo, B.M., Clement, B.G., and Dick, G.J. (2007a). Biotransformations of Manganese. *Manual of Environmental Microbiology*, 3rd Edn, eds C Hurst, R Crawford, J Garland, D Lipson, A Mills, and L Stetzenbach (Washington, DC: ASM Press), 1225–1235.
- Tebo, B.M., Clement, B.G., and G.J., D. (2007b). Biotransformations of Manganese. *Manual of Environmental Microbiology*, 3rd Edition, 1225-1235.
- Tebo, B.M., and Emerson, S. (1985). Effect of Oxygen Tension, Mn(II) Concentration, and Temperature on the Microbially Catalyzed Mn(II) Oxidation Rate in a Marine Fjord. *Appl Environ Microbiol* 50, 1268-1273.
- Tebo, B.M., Ghiorse, W.C., Waasbergen, L.G.V., Siering, P.L., and Caspi, R. (1997). Bacterially-mediated mineral formation: insights into manganese(II) oxidation from molecular genetic and biochemical studies, Vol 35 (Washington, D.C.: Mineralogical Society of America).
- Tebo, B.M., Johnson, H.A., McCarthy, J.K., and Templeton, A.S. (2005). Geomicrobiology of manganese(II) oxidation. *Trends Microbiol* 13, 421-428.
- Templeton, A.S., Staudigel, H., and Tebo, B.M. (2005). Diverse Mn(II) oxidizing bacteria isolated from submarine basalts at Loihi Seamount. *Geomicrobiology* 22, 127–139.
- Thamdrup, B., and Canfield, D.E. (1996). Pathways of carbon oxidation in continental margin sediments off central Chile. *Limnol Oceanogr* 41, 1629-1650.
- Toner, B., Fakra, S., Villalobos, M., Warwick, T., and Sposito, G. (2005). Spatially resolved characterization of biogenic manganese oxide production within a bacterial biofilm. *Appl Environ Microbiol* 71, 1300-1310.
- Tribedi, P., and Sil, A.K. (2013). Bioaugmentation of polyethylene succinate-contaminated soil with *Pseudomonas* sp. AKS2 results in increased microbial activity and better polymer degradation. *Environ Sci Pollut Res Int* 20, 1318-1326.
- Tsuji, K., Asayama, T., Shiraki, N., Inoue, S., Okuda, E., Hayashi, C., Nishida, K., Hasegawa, H., and Harada, E. (2017). Mn accumulation in a submerged plant *Egeria densa* (Hydrocharitaceae) is mediated by epiphytic bacteria. *Plant Cell Environ* 40, 1163-1173.
- Tyler, P.A., and Marshall, K.C. (1967). Microbial oxidation of manganese in hydro-electric pipelines. *Antonie Van Leeuwenhoek* 33, 171-183.
- Ude, S., Arnold, D.L., Moon, C.D., Timms-Wilson, T., and Spiers, A.J. (2006). Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates. *Environ Microbiol* 8, 1997-2011.

- van Veen, J.A., van Overbeek, L.S., and van Elsas, J.D. (1997). Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 121-135.
- Vandenabeele, J., de Beer, D., Germonpre, R., and Verstraete, W. (1992). Manganese oxidation by microbial consortia from sand filters. *Microb Ecol* 24, 91-108.
- Vlamakis, H., Aguilar, C., Losick, R., and Kolter, R. (2008). Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes Dev* 22, 945-953.
- Vlamakis, H., Chai, Y., Beauregard, P., Losick, R., and Kolter, R. (2013). Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat Rev Microbiol* 11, 157-168.
- Vogel, T.M. (1996). Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Curr Opin Biotechnol* 7, 311-316.
- Wang, M., Yang, G., Min, H., Lv, Z., and Jia, X. (2009). Bioaugmentation with the nicotine-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. HF-1 in a sequencing batch reactor treating tobacco wastewater: degradation study and analysis of its mechanisms. *Water Res* 43, 4187-4196.
- Wang, X., Wiens, M., Divekar, M., Grebenjuk, V.A., Schroder, H.C., Batel, R., and Muller, W.E. (2010). Isolation and characterization of a Mn(II)-oxidizing *Bacillus* strain from the demosponge *Suberites domuncula*. *Mar Drugs* 9, 1-28.
- Wang, Z., Yang, Y., Sun, W., Dai, Y., and Xie, S. (2015). Variation of nonylphenol-degrading gene abundance and bacterial community structure in bioaugmented sediment microcosm. *Environ Sci Pollut Res Int* 22, 2342-2349.
- Welker, M., and Moore, E.R. (2011). Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Syst Appl Microbiol* 34, 2-11.
- Werner, E., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J., Heydorn, A., Molin, S., Pitts, B., and Stewart, P.S. (2004). Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 70, 6188-6196.
- White, A.P., and Surette, M.G. (2006). Comparative genetics of the *rdar* morphotype in *Salmonella*. *J Bacteriol* 188, 8395-8406.
- Whitney, J.C., and Howell, P.L. (2013). Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol* 21, 63-72.
- Williamson, K.S., Richards, L.A., Perez-Osorio, A.C., Pitts, B., McInnerney, K., Stewart, P.S., and Franklin, M.J. (2012). Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms includes expression of ribosome hibernation factors in the antibiotic-tolerant subpopulation and hypoxia-induced stress response in the metabolically active population. *J Bacteriol* 194, 2062-2073.
- Yang, L., Li, X., Chu, Z., Ren, Y., and Zhang, J. (2014). Distribution and genetic diversity of the microorganisms in the biofilter for the simultaneous removal of arsenic, iron and manganese from simulated groundwater. *Bioresour Technol* 156, 384-388.
- Yang, W., Zhang, Z., Zhang, Z., Chen, H., Liu, J., Ali, M., Liu, F., and Li, L. (2013). Population structure of manganese-oxidizing bacteria in stratified soils and properties of manganese oxide aggregates under manganese-complex medium enrichment. *PLoS One* 8, e73778.
- Yu, F.P., Callis, G.M., Stewart, P.S.S., Griebe, T., and Mcfeters, G.A. (1994). Cryosectioning of biofilms for microscopic examination. *Biofouling* 8, 85-91.
- Yu, Z., and Mohn, W.W. (2002). Bioaugmentation with the resin acid-degrading bacterium *Zoogloea resiniphila* DhA-35 to counteract pH stress in an aerated lagoon treating pulp and paper mill effluent. *Water Res* 36, 2793-2801.
- Zein, M.M., Suidan, M.T., and Venosa, A.D. (2004). MtBE biodegradation in a gravity flow, high-biomass retaining bioreactor. *Environ Sci Technol* 38, 3449-3456.
- Zhang, Z., Zhang, Z., Chen, H., Liu, J., Liu, C., Ni, H., Zhao, C., Ali, M., Liu, F., and Li, L. (2015). Surface Mn(II) oxidation actuated by a multicopper oxidase in a soil bacterium leads to the formation of manganese oxide minerals. *Sci Rep* 5, 10895.
- Zhu, X., Liu, R., Liu, C., and Chen, L. (2015). Bioaugmentation with isolated strains for the removal of toxic and refractory organics from coking wastewater in a membrane bioreactor. *Biodegradation* 26, 465-474.



- Zimaro, T., Thomas, L., Marondedze, C., Sgro, G.G., Garofalo, C.G., Ficarra, F.A., Gehring, C., Ottado, J., and Gottig, N. (2014). The type III protein secretion system contributes to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* biofilm formation. *BMC Microbiol* 14, 96.
- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., and Romling, U. (2001). The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* 39, 1452-1463.